

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
MUND-, KIEFER-, UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. TORSTEN E. REICHERT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

KORRELATION DER MAGE-A-ANTIGENEXPRESSION IM
PLATTENEPITHELKARZINOM DES MUND-, KIEFER-, UND
GESICHTSBEREICHES MIT KLINISCHEN PARAMETERN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silvia Peters

2010

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
MUND-, KIEFER-, UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. TORSTEN E. REICHERT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

KORRELATION DER MAGE-A-ANTIGENEXPRESSION IM
PLATTENEPITHELKARZINOM DES MUND-, KIEFER-, UND
GESICHTSBEREICHES MIT KLINISCHEN PARAMETERN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silvia Peters

2010

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gottfried Schmalz
Tag der mündlichen Prüfung:	28.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Hintergrund des Karzinoms des Kopf- und Halsbereiches	7
1.1.1. Epidemiologie	7
1.1.2. Klassifikation	8
1.1.3. Therapie	12
1.2. MAGE-A Antigene	12
1.2.1. Allgemeines	12
1.2.2. Funktionen während der Tumorgenese	14
1.2.3. Funktionen im Rahmen der Zelldifferenzierung und des Zellzyklus	16
1.3. Aufgabenstellung	18
 2. Material und Methoden	 20
2.1. Patientenkollektiv	20
2.2. MAGE-A Antikörper 57B	21
2.3. Immunhistochemische Färbung	22
2.4. Auszählung der gefärbten Zellen	23
2.5. Statistische Analyse	24
 3. Ergebnisse	 25
3.1. Expressionsmuster der MAGE-A Antigene	25
3.2. Korrelation des Scores mit dem Geschlecht der Patienten	25
3.3. Korrelation des Scores mit dem Alter der Patienten	27
3.4. Korrelation des Scores mit dem Entdifferenzierungsgrad des Tumors	29
3.5. Korrelation des Scores mit der pT-Klassifikation	31

3.6. Korrelation des Scores mit der Lokalisation des Tumors	33
3.7. Korrelation des Scores mit den Risikofaktoren des Patienten	34
3.8. Korrelation des Scores mit anderen Tumorerkrankungen	35
3.9. Korrelation des Scores mit der pN-Klassifikation	36
3.10. Korrelation des Scores mit der Tumorhistologie	39
 4. Diskussion	 44
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Autoren	44
4.1.1. Expressionsmuster der MAGE-A Antigene	44
4.1.2. Korrelation des Scores mit dem Geschlecht der Patienten	45
4.1.3. Korrelation des Scores mit dem Alter der Patienten	45
4.1.4. Korrelation des Scores mit dem Entdifferenzierungsgrad des Tumors	46
4.1.5. Korrelation des Scores mit der pT-Klassifikation	47
4.1.6. Korrelation des Scores mit der Lokalisation des Tumors	48
4.1.7. Korrelation des Scores mit den Risikofaktoren des Patienten	48
4.1.8. Korrelation des Scores mit anderen Tumorerkrankungen	49
4.1.9. Korrelation des Scores mit der pN-Klassifikation	49
4.1.10. Korrelation des Scores mit der Tumorhistologie	49
4.2. Perspektiven	50
4.2.1. CTA-Expression als Ausgangspunkt für die Immuntherapie	50
4.2.2. CTA-Expression als diagnostisch relevanter Faktor	52
4.2.3. CTA-Expression als Prognosefaktor	54
 5. Zusammenfassung	 56
 6. Literaturverzeichnis	 57
 7. Abkürzungsverzeichnis	 70

1. Einleitung

1.1. Hintergrund des Karzinoms des Kopf- und Halsbereiches

1.1.1 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von 274.000 Fällen im Jahre 2002 befand sich das Karzinom der Mundhöhle weltweit auf Platz acht der Liste der häufigsten Karzinome bei Männern und auf Platz 13 bei Frauen [1].

Europaweit wurden 2006 101.600 Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome diagnostiziert. Damit befanden sie sich an siebter Stelle der malignen Tumorerkrankungen für Männer und Frauen, mit einem Anteil von 3,2% aller Krebsarten (ausgenommen Hautkrebs, aber inklusive Melanome) [2].

Innerhalb Europas variiert die jährliche Inzidenz in der männlichen Bevölkerung regional sehr stark, von 5,9 Fälle auf 100.000 Einwohner in Finnland bis 32 Fälle auf 100.000 in Frankreich [3].

In Nord- und Westeuropa ist die Inzidenz für Frauen während der letzten Jahrzehnte gestiegen, während die Inzidenz für Männer gesunken ist. Dies hängt mit der zunehmenden Zahl an Raucherinnen und mit der abnehmenden Zahl an Rauchern in diesen Regionen zusammen [3].

Das Verhältnis der Inzidenz für Männer zu der für Frauen ist folglich gesunken und variiert zwischen 1,5:1 und 2,5:1 in Nordeuropa und 7,7:1 in Litauen [3].

Europaweit gab es 2006 42.400 Todesfälle durch Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome. Damit befindet sich die von ihnen ausgehende Mortalität mit einem Anteil von 2,5% an 11ter Stelle aller Krebsarten (ausgenommen Hautkrebs, aber inklusive Melanome) [2].

Genau wie die Inzidenz variiert die Mortalität innerhalb Europas bei Männern sehr stark zwischen 1,3 Fälle auf 100.000 Einwohnern in Italien und 10,3 Fälle auf 100.000 Einwohnern in Litauen [3].

In Deutschland liegt die Neuerkrankungsrate an oro-pharyngealen Plattenepithelkarzinomen bei etwa 10.000 Patienten im Jahr, wobei ca. 75% davon Männer sind [4]. Diese Tumoren stehen für deutsche Männer an 7ter und für deutsche Frauen an 15ter Stelle aller malignen Tumorerkrankungen [4].

Die WHO (World Health Organisation) sagt für die nächsten Jahrzehnte weiterhin eine steigende Inzidenz für das Mundhöhlenkarzinom voraus [5].

Plattenepithelkarzinome (PEC) der Schleimhäute des oberen Aerodigestivtrakts stellen in der westlichen Welt mit 95% die häufigsten Kopf-Hals-Tumoren dar [6].

Die häufigsten ätiologischen Faktoren sind Alkohol- und Tabakkonsum [5, 7-10]. Den Zusammenhang zwischen dem Tabakkonsum und dem Kopf-Hals-Karzinom beschrieben Wynder et al. bereits 1956 [11]. Besonders die Kombination von Rauchen und Alkoholabusus hat einen supermultiplikativen Effekt auf die Entstehung von PEC der Mundhöhle [12, 13]. Dabei wird die Rolle des Alkohols, einerseits als Lösungsmittel für Teerprodukte, und andererseits auch selbst als primäres Kanzerogen diskutiert [14].

Auch eine genetische Anfälligkeit für Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes im Zusammenhang mit Rauchen und Alkoholabusus konnte in Zentraleuropa nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um einen Polymorphismus in ADH1B (Alkoholhydrogenase) und ALDH2 (Aldehyddehydrogenase) Genen [13].

Weitere Risikofaktoren sind schlechte Mundhygiene und ein inadäquater Zahnstatus [8-10]. Auch ein signifikanter Zusammenhang zu Infektionen mit dem high-risk humanen Papillomavirus (HPV) wird diskutiert [10].

In asiatischen Ländern kommt das Kauen der Betelnuss zu den ätiologischen Faktoren hinzu [5].

Zu den Vorläuferläsionen des oralen PEC gehören einerseits die präkanzerösen Läsionen der Mundschleimhaut wie die Leukoplakie und die Erythroplakie, und andererseits die präkanzerösen Konditionen wie Eisenmangelanämie, der orale Lichen planus, die orale submuköse Fibrose, die Syphilis, das Xeroderma pigmentosum, der Lupus erythematoses und die Epidermolysis bullosa dystrophicans [15].

Die Metastasierung erfolgt vorwiegend in die Lymphknoten der Kopf- und Halsregion [5]. Fernmetastasen kommen mit einer Inzidenz von ca. 13 % [16] eher selten und zu einem späten Zeitpunkt vor und sind hauptsächlich in der Lunge und im Knochen lokalisiert [17, 18]. Die Inzidenz von Fernmetastasen korreliert mit der Progression des Primärtumors und mit dem Grad der Lymphknotenmetastasierung [17-19]. Das Risiko, einen zweiten primären Tumor in der Mundhöhle zu entwickeln, wird mit 4,3-30% angegeben [5].

1.1.2. Klassifikation

Bislang gilt die TNM (Tumor Nodus Metastasen)-Klassifikation, nach der sich auch das therapeutische Vorgehen richtet, als wichtigster Prognosefaktor für das PEC des Kopf- und

Halsbereichs [20, 21]. Das TNM-System teilt die Tumoren, wie in Tabelle 1 dargestellt, nach der Größe des Primärtumors (T1 bis T4), nach dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen (N0 bis N3) und nach dem Ausmaß der Fernmetastasierung (M0 und M1) ein [22].

Beurteilungskriterium		Beschreibung
Tumorgröße	Tis	Carcinoma in situ
	T0	Kein Primärtumor vorhanden
	T1	Primärtumor mit maximalem Durchmesser von 2,0cm
	T2	Primärtumor mit maximalem Durchmesser von >2,0cm, ≤ 4,0cm
	T3	Primärtumor mit maximalem Durchmesser >4,0cm
	T4	Primärtumor mit Invasion in Nachbarorgane
	TX	Primärtumor nicht bestimmbar
Lymphknotenstatus	N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
	N1	Metastasen in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten mit maximalem Durchmesser von 3,0cm
	N2a	Metastasen in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten mit maximalem Durchmesser von >3,0cm, ≤ 6,0cm
	N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten mit maximalem Durchmesser ≤ 6,0cm
	N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten mit maximalem Durchmesser von ≤ 6,0cm
	N3	Eine oder mehrere Lymphknotenmetastasen mit maximalem Durchmesser > 6,0cm
	NX	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
Fernmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
	M1	Fernmetastasen vorhanden
	MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar

Tabelle 1:

TNM-Klassifikation [22]

Die sechste und jüngste Auflage der TNM-Klassifikation der UICC (Union International Contre Le Cancer) und der AJCC (American Joint Committee on Cancer) enthält eine neue

Einteilung für die fortgeschrittenen Fälle. Dadurch werden durch den Tumor beeinflusste lokale anatomische Strukturen berücksichtigt, die möglicherweise das Überleben genauso beeinflussen wie Fernmetastasen [23].

Die T4-Tumoren der Mundhöhle und des Oropharynx werden hierbei jeweils in eine T4a Gruppe mit gemäßigttem Risiko (z.B. Infiltration kortikalen Knochens, der Zungenmuskulatur, der Kieferhöhle oder der Gesichtshaut bei Tumoren der Mundhöhle) und eine T4b-Gruppe mit hohem Risiko (Palliativstadium, z.B. Infiltration des Spatium masticatorum, der Proc. Pterygoides, der Schädelbasis oder der A. carotis interna bei Tumoren der Mundhöhle) eingeteilt. Für die PEC der Lippe gibt es nur eine T4a-Gruppe [22].

Die komplexe TNM-Klassifikation wird zur Beurteilung des Schweregrades der Tumorerkrankung in vier Tumorstadien eingeteilt: die frühen Tumorstadien I und II und die fortgeschrittenen Stadien III und IV [22].

Tumorstadien			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stadium IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Stadium IVB	Beliebiger T	N3	M0
	T4b	Beliebiger N	M0
Stadium IVC	Beliebiger T	Beliebiger N	M1

Tabelle 2:
Einteilung in Tumorstadien [22]

Als wichtiger unabhängiger Prognosefaktor gilt neben dem TNM-Stadium auch der Entdifferenzierungsgrad der Tumorzellen (G = Grading), der in gut (G1), mäßig (G2) und schlecht differenziert (G3) eingeteilt wird [21, 22]. Schlecht differenzierte Tumoren, metastasieren öfter in die regionalen Lymphknoten, weisen häufiger keine tumorfreien Resektionsränder auf und führen zu einer reduzierten Überlebensrate [21].

Weitere histopathologische Kriterien zur Einschätzung der Tumorprognose sind Einbrüche und Ausbreitung des Tumors in locoregionäre Lymphbahnen (L= Lymphatic vessels) oder Venen (V= Veins) und ein kapselüberschreitendes Wachstum bei Lymphknotenmetastasen [24-26].

Wenzel et al. zeigten 2004, dass bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und insbesondere der Kapselruptur die T-Kategorie und die Infiltrationstiefe ihren prognostischen Einfluss verlieren [24]. Die prognostische Aussagekraft von Merkmalen des Primärtumors wie Größe und Infiltrationstiefe beschränkt sich auf nicht metastasierende Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome [24].

Obwohl die TNM-Klassifikation noch immer das entscheidende Kriterium ist, nach dem sich die Wahl der Therapieform richtet, wurde des Öfteren gezeigt, dass Tumoren derselben TNM-Klassifikation unterschiedliche prognostische Faktoren besitzen können und von unterschiedlicher biologischer Aggressivität und unterschiedlichem klinischen Verhalten sein können [5].

So zeigen z.B. eine Vielzahl von klinisch kleinen Tumoren starke biologische Aggressivität, frühe regionale Metastasierung und eine reduzierte Überlebenszeit, während einige große Tumoren nur sehr langsam in regionale und entfernte Gebiete metastasieren und eine sehr lange posttherapeutische tumorfreie Zeit nach sich ziehen [21].

Ein prognostisches System, das auf histomorphologischen und molekularen Parametern basiert, die das Tumorverhalten und die Tumoraggressivität vorhersagen können, könnte die TNM-Klassifikation unterstützen individuelle Therapieoptionen vorzugeben und die Überlebensrate steigern. Ein solches System könnte darüber hinaus auch Ausgangspunkt für neue adjuvante Therapieformen sein [5, 21].

Für solch ein System kommen Marker in Betracht, die exklusiv auf maligne transformierten Zellen auftreten (Tumorantigene). Eine solche Markergruppe stellen die cancer/testis Antigene (CTA) mit ihrer Untergruppe der MAGE-A Antigene dar [27].

Die folgende Arbeit hat Untersuchungen zu diesen MAGE-A Antigenen zum Inhalt.

1.1.3. Therapie

Die Therapie der Wahl ist auch bei sehr großen Tumoren (T4b mit N1) die Resektion mit lokaler Lymphadenektomie. Dabei wird heute zwischen der kompletten Tumorkontrolle und dem funktionellen und ästhetischen Ergebnis genau abgewogen. Die Ausräumung der Lymphknoten wird nicht mehr zwingend radikal vorgenommen, sondern unter Erhalt funktionstragender Strukturen. Die Laserchirurgie stellt, vor allem im Bereich des Larynx, eine neue Möglichkeit der kompletten Resektion bei gleichzeitigem Erhalt der Organe dar [28].

Bei Plattenepithelkarzinomen mit schlechter Prognose wird standardmäßig die adjuvante Radiochemotherapie eingesetzt. Die Radiochemotherapie als alleinige Therapieform wird nur bei solchen Tumoren eingesetzt, die nicht reseziert werden können [29].

Die adjuvante Radiochemotherapie führt zwar bei PEC mit schlechter Prognose zu einem höheren Therapieerfolg, geht aber gleichzeitig mit einer höheren Morbidität und Toxizität einher [29]. So führt sie z.B. in fast 100% der Fälle zu einer Mukositis [30]. Des Weiteren kann sie z.B. Dysphagien, Schädigungen der Speicheldrüsen und des Geschmacksinns, Candida und Nekrosen des Knochens und der Mundschleimhaut bewirken [29].

Neuartige Therapeutika, die auf molekularer Ebene wirken, könnten zytotoxische Therapeutika ersetzen und so die Lebensqualität der Patienten erhöhen und ihren Leidensdruck verringern [29].

Trotz der Fortschritte in der chirurgischen Therapie, der Verbesserung der Radio- und Chemotherapie durch IMRT (Intensity Modulated Radiotherapie), Hyperfraktionierung und radiosensitiven Chemotherapeutika, konnte in den letzten Jahrzehnten keine wesentliche Verbesserung der Fünf-Jahres-Überlebensquote festgestellt werden [28, 29, 31].

1.2. MAGE-A Antigene

1.2.1. Allgemeines

1991 entdeckte Thierry Boon das erste CT-Antigen, MAGE-A1 (melanoma-associated antigen A1), durch die Erkennung desselbigen durch cytotoxische T-Zellen [32].

Seither wurden dutzende Mitglieder der MAGE-Genfamilie identifiziert, die gemeinsame homologe Regionen, darunter die MHD (MAGE homology domain), besitzen [33] und auf dem X-Chromosom lokalisiert sind [27].

Die Unterteilung der MAGE-Gene bezüglich ihrer Expression erfolgt in die Subgruppe MAGE I, die MAGE-A, -B, und -C beinhaltet, und MAGE II [33].

MAGE II werden in vielen verschiedenen normalen Geweben des erwachsenen Organismus exprimiert [33].

Die Expression von MAGE I, auch als cancer/testis-Antigene bezeichnet, wird vor allem in malignen Tumoren beobachtet. In normalen Geweben ist sie weitgehend auf die Keimzellen des Hodens, den fetalen Ovar und die fetale Plazenta beschränkt und auf unreife Zellen wie Spermatogonien, Oogonien und Trophoblasten begrenzt [34]. Müller-Richter et al. konnten 2008 auch eine Expression in fetalen Keratinozyten nachweisen [35] und kürzlich wurde festgestellt, dass CT-Antigene, wie z.B. N-RAGE, NY-ESO, MAGE-N und SSX auch in mesenchymalen Stammzellen des menschlichen Knochenmarks exprimiert werden. Es gibt jedoch Anhaltspunkte dafür, dass die mesenchymalen Stammzellen der Erkennung und der Lyse durch CT-spezifische cytotoxische T-Lymphozyten entgehen können [34].

Des Weiteren wurden CT mRNA Kopien in normalen Geweben, besonders im Pankreas, nur in einer sehr geringen Konzentration entdeckt, die ihr immuntherapeutisches Potential nicht gefährden kann, da sie nicht zu einer ausreichend hohen Konzentration von MHC/CT-Proteinkomplexen führt [36].

Dieses Expressionsmuster der CT-Antigene und ihre Fähigkeit eine Immunantwort auszulösen könnte die Immuntherapie von bösartigen Tumoren mittels spezifischer cytotoxischer T-Zellen ermöglichen [34].

Die MAGE-A Antigene können neben einer zellulären auch eine humorale Immunantwort auslösen [37]. Auch die cancer/testis-Antigene SSX und NY-ESO-1 haben diese Fähigkeiten, im Gegensatz zu den anderen cancer/testis-Antigenen, die entweder von einer T-Zell-vermittelten oder einer humoralen Immunreaktion erkannt werden können [37].

Die Expression von MAGE I-Genen ist vorwiegend durch die Demethylierung des Promotors und durch Histon-Deacetylierung gesteuert [38-40].

Obwohl in nicht MAGE-A1 exprimierenden Tumoren alle Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung des MAGE-A1-Promotors vorhanden sind, wird MAGE-A1 nicht exprimiert. Erst nach der Demethylierung des Promotors können auch diese Tumoren MAGE-A1 exprimieren [40].

MAGE I-Gene spielen während der embryonalen Entwicklung eine Rolle. In den Embryonalzellen sind sie viel weniger CpG-methyliert, als in normalen Zellen. Nach der Embryonalentwicklung werden die MAGE I-Gene durch Methylierung deaktiviert. Neoplastisch veränderte Zellen sind wiederum hypomethyliert. Folglich werden die MAGE Gene als Ergebnis der Tumorgenese reaktiviert, exprimiert und können Ziele von Antigenen werden [38].

Die humane MAGE-A-Genfamilie besteht aus 12 Gene (MAGE-A1 bis MAGE-A12), deren Genprodukte durch HLA-I-Moleküle präsentiert werden und dadurch durch cytotoxische T-Zellen auf der Oberfläche von Tumoren erkannt werden können [38].

Ries et al. fanden 2005 heraus, dass die MAGE-A1 bis MAGE-A6-Gene in 71% der untersuchten PEC exprimiert wurden, während keine Expression dieser Gene in Proben gesunden Plattenepithels der Mundhöhle festgestellt werden konnte [41].

MAGE-Antigene werden im Kopf- und Halsbereich auch in anderen malignen Tumoren neben dem PEC und in präkanzerösen Läsionen exprimiert, nicht aber in benignen Tumoren [42, 43].

Obwohl die genaue Funktion der MAGE-Gene noch weitgehend unbekannt ist, wurden bereits Studien durchgeführt, in denen MAGE-Antigene das Ziel von Immuntherapien darstellten [28, 31, 44, 45].

1.2.2. Funktionen während der Tumorgenese:

Einige MAGE-Antigene wirken sich fördernd auf die Tumorprogression aus:

MAGE-A1 vermindert die Aktivierung von NOTCH, indem es eine c-terminale Bindung mit SKIP eingeht. NOTCH wird wiederum nur aktiviert, wenn es an SKIP bindet [46]. NOTCH spielt eine wichtige Rolle in der Gewebedifferenzierung. Die Aktivierung von NOTCH1 führt zu gesteigerter Zelldifferenzierung und zum Verlassen des Zellzyklus [47, 48]. Dahingegen führt eine Suppression von NOTCH1 zur Zellhyperplasie [48]. Eine verminderte Aktivierung von NOTCH begünstigt somit die Tumorprogression und wirkt der Zelldifferenzierung entgegen. Folglich reduziert MAGE-A1 die tumorsupprimierende Wirkung von NOTCH [46-49].

Es wurde gezeigt, dass Genprodukte von MAGE-A2 das Tumorsuppressorgen p53 in seiner Funktion hindern. Das erhöht das Zellwachstum und vermindert die Apoptose. Auch eine

Resistenz gegen Chemotherapeutika wurde im Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von MAGE-A2 Genprodukten nachgewiesen [50].

Yang B. et al. zeigten 2007, dass die Unterdrückung von MAGE I zur Apoptose in MAGE-positiven Melanomzelllinien führt. Mitglieder der MAGE-A, -B und -C Familie formen Komplexe mit KAP1 und hindern somit die Expression und Funktion von p53, was wiederum zu einer Progression der Tumoren führt [51].

Im Zusammenhang mit MAGE-A4 wird auch von tumorsuppressiven Wirkungen berichtet: MAGE-A4 ist, im Gegensatz zu seinen sehr ähnlichen Genfamilienmitgliedern MAGE-A1, -A2 und -A12, in der Lage mit seinem C-Terminus an Gankyrin zu binden [52]. Im Leberzellkarzinom ist die Expression von Gankyrin sehr hoch und eine Bindung von Gankyrin an Rb (Retinoblastoma tumor suppressor gen) hindert dessen tumorsupprimierende Wirkung [53]. Gankyrin wirkt auch den Tumorsuppressorgenen p16 und p18 und p53 entgegen [52, 54]. Durch die Bindung von MAGE-A4 an Gankyrin wird dessen kanzerogene Aktivität supprimiert [52].

Sakurai T et al. fanden 2004 heraus, dass durch genotoxischen Stress die C-terminalen 107 Aminosäuren des MAGE-A4-Antigens (MAGE-A4DeltaN1) abgespalten werden können und eine p53 abhängige und eine p53 unabhängige Apoptose auslösen können [55]. MAGE-A4DeltaN1 führt zu der Zerstörung der mitochondrialen Integrität durch die Downregulierung von Bcl-xL und führt so zur Apoptose. Durch die Bindung von MAGE-A4DeltaN1 an MIZ-1 (myc-interagierendes Zinkfinger-Transkriptionsprotein) erfolgt die Downregulierung der p21-Expression, was ebenfalls zur Apoptose führt. Darüber hinaus erhöht MAGE-A4DeltaN1 auch den p53 Proteinspiegel [55].

Die MAGE-A Expression in Tumorzellen steht im direkten Zusammenhang zur Malignität des Tumors und beeinflusst den Therapieerfolg:

Park JH et al. zeigten 2002, dass Zelllinien, die mindestens einen der drei MAGE-A-Genfamilienvertreter, MAGE-A1, MAGE-A2 oder MAGE-A3 exprimieren, resistenter gegenüber der Toxizität des Tumornekrosefaktors (TNF) sind, als Zellen, die keine dieser MAGE-A-Antigene exprimieren [56]. Dadurch wird demonstriert, dass diese MAGE-A eine protektive Wirkung für die Tumorzelle haben.

Die verstärkte Expression von MAGE-A2 und MAGE-A6 Genen in Tumoren geht mit einer Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika Paclitaxel und Doxorubicin einher und steigert folglich die Aggressivität des Tumors [57].

1.2.3. Funktionen im Rahmen der Zelldifferenzierung und des Zellzyklus

Wie oben beschrieben ist nachgewiesen worden, dass MAGE durch Hypomethylierung oder Histon-Deacetylierung aktiviert werden [38-40].

Nach Old LJ muss es darüber hinaus noch andere Faktoren geben, die zu der Aktivierung von CT-Antigenen führen. Schließlich werden nicht alle CT-Antigene in jedem Tumor exprimiert und die Expressionsmuster sind auch in gleichartigen Tumoren heterogen [58]. Die „Gametogenetic program induction in cancer“ Theorie, die 2001 von Old LJ publiziert wurde, geht davon aus, dass in den Krebszellen ein gametogenetisches Programm abläuft und die verschiedenen Expressionsmuster der CT-Antigene in den Krebszellen verschiedene Stadien der mindestens vier verschiedenen Wege der Keimzellentwicklung widerspiegeln: Entwicklung der Keimzelle zu:

A: einer Keimzelle,

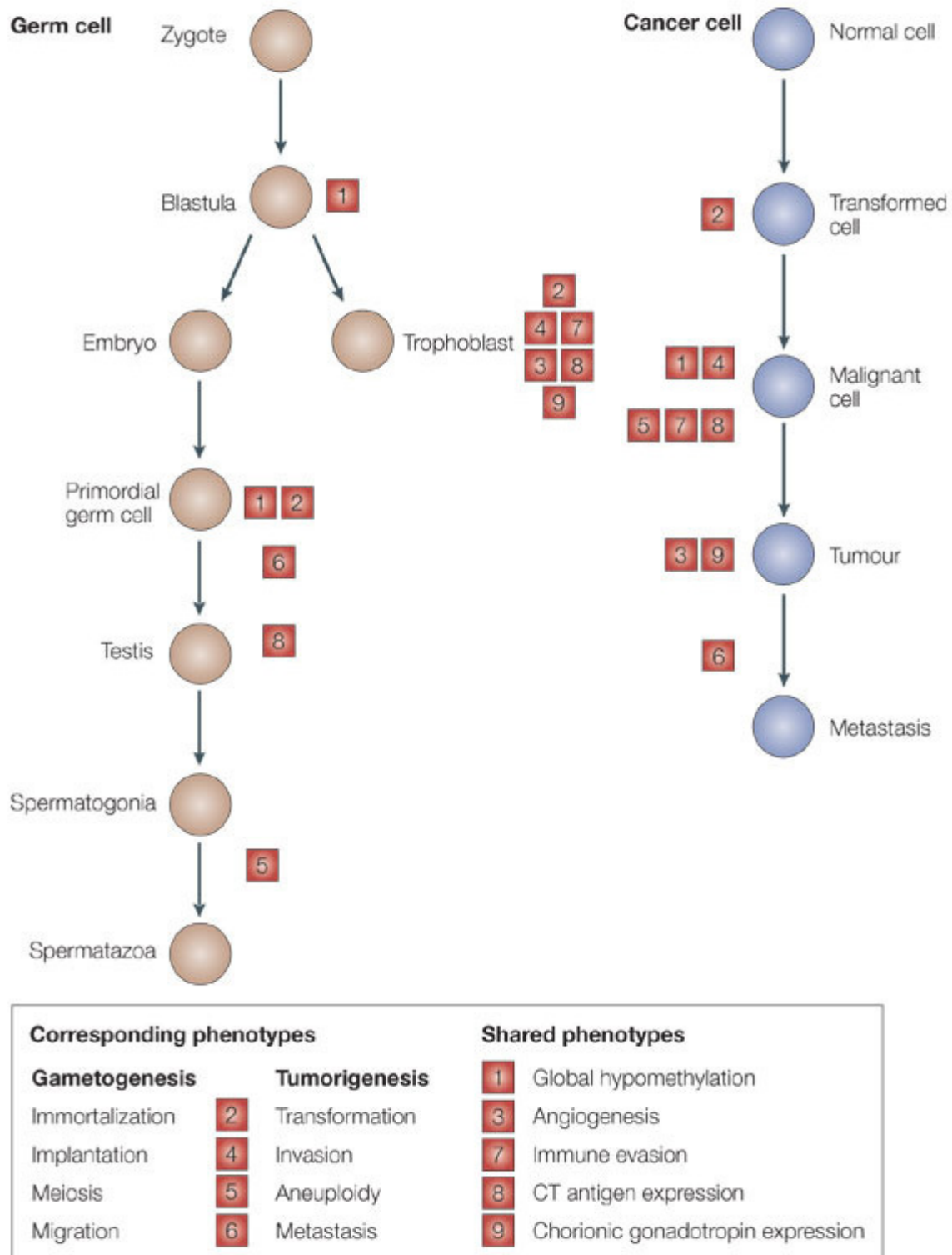
B: einer Oogonie und Oozyte,

C: einer Spermatogonie und Spermienzelle, oder

D: einem Trophoblast.

Für die Aktivierung des gametogenetischen Programms könnten Mutation in verschiedenen Genen wie z.B. Onkogene oder Suppressorgene verantwortlich sein. Auch die Aktivierung eines einzelnen CT-Gens könnte andere CT-Gene eines gametogenetischen Programms aktivieren [58].

Gemeinsame Merkmale von Tumorzellen und Zellen in der Keimzellen-, Trophoblasten- und Gametenentwicklung sind unter anderem (wie auch in Abbildung 1 veranschaulicht): Unsterblichkeit, Invasion, fehlende Adhäsion, Angiogenese, Demethylierung und die verminderte Expression von Molekülen des major histocompatibility complexes (MHC) [57, 58].



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Abbildung 1:

Gemeinsame Merkmale von Tumorzellen und Zellen in der Keimzellen-, Trophoblasten- und Gametenentwicklung [57]

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass in Krebszellen das trophoblastische Hormon humanes Choriogonadotropin (hCG) produziert wird [59].

Bekannte CT-Gen Funktionen während der Gametogenese beschränken sich auf SCP-1, OY-TES-1, BORIS und CT15/Fertilinβ. SCP-1 spielt eine Rolle bei der Paarung der Chromosomen in der Meiose. OY-TES-1 ist bei der Zusammenlagerung von Akrosin im Spermienkopf beteiligt. Akrosin ermöglicht das Eindringen des Spermiums in die Eizelle. BORIS ist für das Eintreten der Zelle in die Endrunde der Mitose während der Spermatogenese zuständig [27]. CT15/Fertilinβ ist eine Protease, die an der durch Integrin gesteuerten Interaktion zwischen Eizellmembran und Spermium beteiligt ist [37]. Die Rolle dieser Proteine während der Tumorgenese ist noch weitgehend unklar [27].

MAGE-A1 wird mit stark proliferierenden Keimzellen assoziiert. Der Anfang des zweiten Trimenons stellt die Periode der Proliferation der Oogonien und Gonozyten dar. Zu diesem Zeitpunkt wird MAGE-A1 stark exprimiert. Am Ende des zweiten Trimenons, wenn die Oogonien und Gonozyten differenzieren und der Zellzyklus zum Stillstand kommt, geht die Expression von MAGE-A1 signifikant zurück. Im Ovar des dritten Trimenons und im neonatalen Ovar wird MAGE-A1 gar nicht oder in weniger als 1% der Zellen exprimiert. Adulte Oozyten sind MAGE-A1 negativ [60].

Ein ähnliches Expressionsmuster wird für Mage-b4, das die gleiche MHD wie das humane MAGE-B4 besitzt, in männlichen Keimzellen von Mäusen beobachtet. Es wird in Zellen exprimiert, die noch nicht in die Meiose eingetreten sind. Seine Expression sinkt, wenn die Zellen in die Meiose eintreten und ist im Pachytän nicht mehr nachzuweisen. Vermutlich hält Mage-b4 die männlichen Keimzellen in einem undifferenzierten Stadium. Werden die Proteine von Mage-b4 entfernt, tritt die Zelle in die Meiose ein [61].

1.3. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurden histopathologische Schnitte von 48 Patienten mit primären PEC des Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereichs immunhistochemisch angefärbt und dadurch die Expressionshäufigkeit der MAGE-A Antigene dargestellt. Die Ergebnisse wurden mit der Tumorgroße, dem Infiltrationsverhalten, dem Entdifferenzierungsgrad, dem Lymphknotenbefall, dem Geschlecht und dem Alter der Patienten, vorhandenen

Risikofaktoren, früheren und simultanen Tumorgeschehen, der Histologie und der Tumorlokalisation korreliert.

Ziel dieser Arbeit ist es, Zusammenhänge zwischen der Expressionshäufigkeit von MAGE-A und klinischen sowie histologischen Parametern zu prüfen und darzustellen. Diese Zusammenhänge könnten wichtig für die frühzeitige Diagnostizierung von PEC, für ihre prognostische Einschätzung und für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten sein.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Studie wurden die Daten von 48 Patienten retrospektiv untersucht, bei denen im Jahr 2005 ein primär unvorbehandeltes PEC im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Regensburg reseziert wurde.

Die Patientendaten wurden retrospektiv nach Aktenlage erhoben und im zentralen Tumorregister des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK) verwaltet.

Die Patientengruppe besteht aus 35 Männern und 13 Frauen.

Der Altersdurchschnitt bei Diagnosestellung betrug in der Gruppe der Männer 61 Jahre und in der der Frauen 65 Jahre. 11 Patienten waren zwischen 30 und 50 Jahre alt, 21 zwischen 50 und 70 und 16 zwischen 70 und 100 Jahre alt.

12/48 Patienten litten bereits zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Tumorerkrankung, die restlichen 36 hatten kein früheres Tumorleiden.

15/48 Patienten gaben an keinen Alkohol und kein Nikotin zu konsumieren, 33/48 Patienten hatten eine positive Nikotin- oder Alkoholanamnese und 29 der 33 Patienten konsumierten beides.

4 Tumoren waren auf der Zunge lokalisiert, 10 auf Lippe und Haut und 34 auf der Mundschleimhaut.

In 28 Fällen wurde ein pT1-Tumor reseziert, in 6 Fällen ein pT2- Tumor, in 4 Fällen ein pT3-Tumor und in 10 Fällen ein pT4-Tumor.

Die histopathologische Untersuchung ergab 22 verhornende, 25 nicht verhornende PEC und 1 Carcinoma in situ (CIS).

6 Tumoren waren gut differenziert, 34 mäßig differenziert und 8 schlecht differenziert.

Bei 20 Patienten ergab die Lymphknotenausräumung einen pN0-Hals, bei 2 Patienten einen pN1-Hals, bei 4 Patienten einen pN2b-Hals, bei 2 Patienten einen pN2c-Hals und bei 20 Patienten wurde keine Lymphknotenausräumung durchgeführt (pNX).

Ein Karzinom des embryonalen Hodens wurde als Positivkontrolle der immunhistochemischen Färbung verwendet (siehe Abbildung 2).

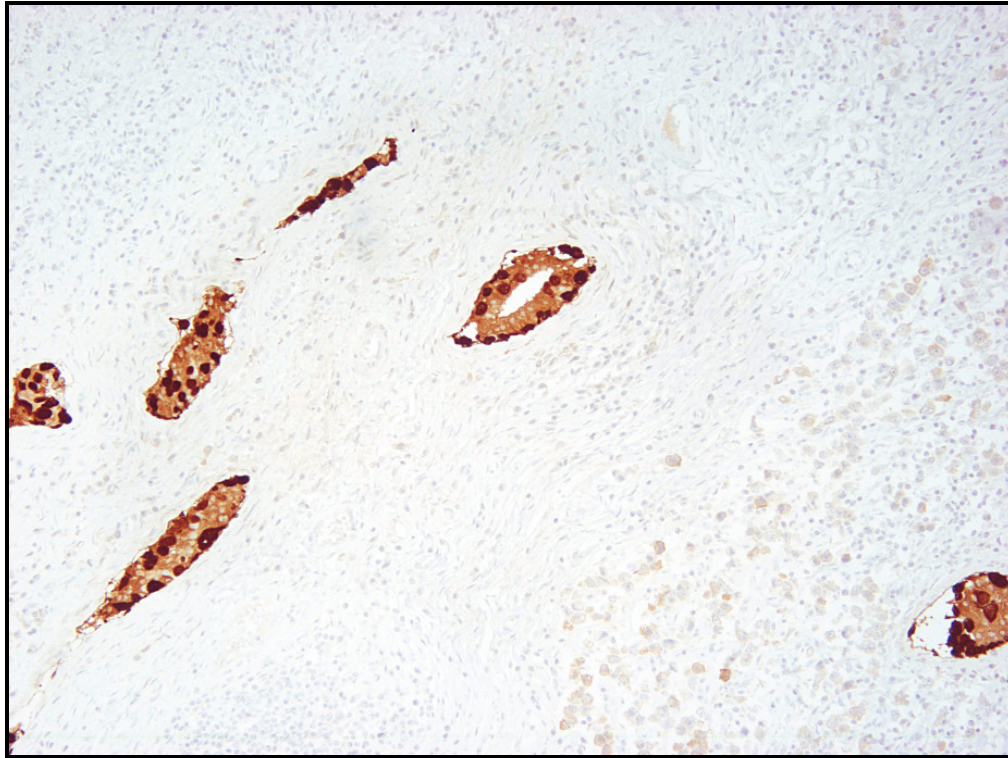


Abbildung 2:

Positivkontrolle:

Embryonales Karzinom des Hodens mit dem globalen MAGE-A Antikörper 57B (100x)

2.2. MAGE-A Antikörper 57B

Für die Immunhistochemie wurde der monoklonale globale MAGE-A Antikörper 57B benutzt, der freundlicherweise von Prof. Giulio C. Spagnoli (onkologische Chirurgie, Institut für chirurgische Forschung und Klinikmanagement, Universitätsklinik Basel, 4031 Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurde.

Zur Züchtung von 57B wurden rekombinante MAGE-A 3 Antigene verwendet [62].

Anschließend Studien hatten allerdings gezeigt, dass manche Tumorproben die MAGE-A3 mRNA enthielten nicht durch 57B angefärbt wurden und andere Tumorproben, die keine MAGE-A3 mRNA exprimierten, trotzdem durch 57B angefärbt werden konnten [63, 64]. Folglich muss 57B auch in der Lage sein, Antigene anderer MAGE zu erkennen.

Landry et al. und Rimoldi et al. konnten im Jahr 2000 nachweisen, dass 57B MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6 und -A12 in Zellen, die mit entsprechender c DNA transfiziert wurden, erkennt [65, 66].

MAGE-A8, -A9, -A10 [66] und -A11 werden nicht erkannt [65].

Rimoldi et al. schlussfolgern 2000 aus weiteren Untersuchungen, dass sich das zuverlässige Anfärben mittels 57B in immunhistochemischen Tumorproben auf MAGE-A4 exprimierende Zellen beschränkt. Das quantitative Expressionsmuster von MAGE-A4 in den untersuchten Gewebeproben wurde im Vergleich zu dem der anderen MAGE-A-Vertreter allerdings in dieser Studie nicht ermittelt. Eine signifikant höhere Expressionsrate von MAGE-A4 im Vergleich zu den anderen MAGE-A-Vertretern, die 57B erkennt, wäre eine Erklärung für das oben genannte Ergebnis [66].

Abbildung 3 zeigt die Aminosäuren an den Positionen 14-31 der Aminosäuresequenz von MAGE-A3, die von 57B erkannt werden. Diese entsprechen exakt denen von MAGE-A2 und -A6 und unterscheiden sich im unterschiedlichen Maße von denen der anderen dargestellten MAGE.

57B erkennt alle MAGE-Vertreter dieser Abbildung, mit Ausnahme von MAGE-A11 und MAGE-A10 [65].

Anti-MAGE-3 MAb 57B

	14	31
MAGE-3	EGLEARGEALGLVGAQAP	
MAGE-1	EALDAQGEALGLVCVQAA	
MAGE-2	EGLEARGEALGLVGAQAP	
MAGE-4	EGVEAQQEALGLVGAQAP	
MAGE-6	EGLEARGEALGLVGAQAP	
MAGE-10	EDLQSQSETQGLEGAQAP	
MAGE-11	EGLQAQEEEDLGLVGAQAL	
MAGE-12	EGLEAQGEALGLVGAQAP	

Abbildung 3:

Die homologen Sequenzen von MAGE-A1, -2, -3, -4, -6, und -12 werden von Anti-MAGE-3 MAb 57B erkannt, während die von MAGE-A10 und -11 nicht erkannt werden [65].

In immunhistologisch gefärbten histo-pathologischen Schnitten erkennt 57B Antigene aus dem Zellkern und aus dem Cytoplasma auch innerhalb der gleichen Zelle [62].

2.3. Immunhistochemische Färbung

Mit dem Schlittenmikrotom wurden Schnittpräparate von ca. 3µm Dicke aus den Resektaten der 48 unvorbehandelten primären PEC angefertigt.

Zur Vorbereitung wurden die Schnitte für 30 Minuten (Min.) bei 60°C in den Brutschrank gestellt.

Die folgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur statt:

Zuerst wurden die Schnitte 2x je 10 Min. mit Xylol und dann 5 Min. mit absteigender Alkoholreihe (2x 100% EtOH, 2x 96% EtOH und 2x 70% EtOH) behandelt.

Danach wurden sie mehrfach gut mit Aqua dest. gespült und in Tris-/EDTA- Puffer pH 9.0 für 4 Min. auf maximaler Leistung bei ca. 900 Watt in der Mikrowelle gekocht. Im Anschluss köchelten sie für 10 Min. auf ca. 280 Watt.

Nachdem die Schnitte im Puffer auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie wiederum mehrfach gut mit Aqua dest. gespült und in das Shandon System mit Coverplates überführt.

Nach der Fixierung wurden die Schnitte mit dem Färbekit DakoCytomation EnVision + Dual Link System- HRP (DakoCytomation Inc., 6392 Via Real, Carpinteria; California, 93013, USA) gefärbt.

Es wurde bei jedem der folgenden Schritte immer 100 µl Flüssigkeit pro Schnitt verwendet.

Als erster Schritt der eigentlichen Färbung wurden die Schnitte 5 Min. mit dem 1:10 verdünnten Dako Wash Buffer gewaschen. Danach wirkte die Peroxidase-Blocking Solution 10 Min. ein. Nachdem Schritt 1 wiederholt wurde, wirkte der 1:100 verdünnte Primärantikörper MAGE-A (57B) 1 Stunde (Std.) ein und Schritt 1 wurde erneut wiederholt. Anschließend wurden die Schnitte 30 Min. mit markierter Polymer- HRP behandelt, erneut wie in Schritt 1 gewaschen und mit 1:50 verdünntem Substrat- Chromogen mit DAB+ behandelt. Schritt 1 wurde zum letzten Mal wiederholt und die Schnitte 1 Min. lang mit 1:5 verdünntem Hematoxylin gegengefärbt.

Zuletzt wurden die Schnitte 5 Min. mit Leitungswasser gewaschen.

Zur Nachbereitung wurden die Schnitte wieder in Aqua dest. überführt, dann mit aufsteigender Alkoholreihe je 5 Min. behandelt: 2x 70% EtOH, 2x 96% EtOH und 2x 100% EtOH. Zum Schluss wurden sie 2x je 10 Min mit Xylol behandelt und mit Entellan eingedeckt.

2.4. Auszählung der gefärbten Zellen

Um die Auszählung der gefärbten Zellen zu veranschaulichen, wurde ein Score von 0 bis 5 festgelegt. 0 bedeutet, dass keine Zellen der Probe angefärbt wurden, 5 bedeutet hingegen,

dass alle Zellen der Probe angefärbt wurden. Dazwischen wurden jeweils Schritte von 25% gelegt, wie in Tabelle 3 zu erkennen ist.

Score	Anteil der gefärbten Zellen
0	0%
1	>0% - 25%
2	>25% - 50%
3	>50% - 75%
4	>75% - <100%
5	100%

Tabelle 3:

Scoresystem

2.5. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde im Lehrstuhl für Statistik des Instituts für Mathematik der Universität Würzburg mit Hilfe von SPSS 15.0.1. durchgeführt. Da von nicht-normalverteilten Daten ausgegangen wurde, wurden nicht parametrische Tests verwendet, um verschiedene unabhängige Variable in einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen. Für Gruppen mit zwei verschiedenen Variablen wurde der Mann-Whitney-U und der Wilcoxon-Test benutzt (Geschlecht und pN/pN+). Für Gruppen mit mehr als zwei verschiedenen Variablen wurde der Kruskal-Wallis und der Chi-Quadrat-Test benutzt (pT, G).

Beim Mann-Whitney-Test werden alle Betrachtungen der Größe nach sortiert und entsprechend Rangzahlen vergeben. Geprüft wird, ob sich die Rangsummen beider Gruppen unterscheiden. Der Kruskal-Wallis-Test ist die Verallgemeinerung des Mann-Whitney-Tests für 3 und mehr Stichproben.

Als der Studie angemessenes Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5% ($p < 0,05$) gewählt.

Die Diagramme wurden mit Microsoft Excel erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Expressionsmuster der MAGE-A Antigene

26/48 Schnitte (54%) wurden durch den monoklonalen MAGE-A Antikörper 57B markiert und konnten dadurch angefärbt werden. 22/48 Schnitte (46%) wurden hingegen nicht angefärbt und exprimieren somit keine MAGE-A-Antigene.

Die weitere Verteilung der Scores stellt sich wie folgt dar und ist in Tabelle 4 zusammengefasst: Score 1 wurde bei 7/48 (15%), Score 2 bei 5/48 (10%), Score 3 bei 3/48 (6%) und Score 4 bei 11/48 (23%) Proben ermittelt.

Score 5 trat nicht auf und wird in den folgenden Graphiken nicht mehr erwähnt.

Score	Anzahl
0	22
1	7
2	5
3	3
4	11
5	0

Tabelle 4:

Verteilung der Scores

3.2. Korrelation des Scores mit dem Geschlecht der Patienten

Bei Männern beträgt der Score im Durchschnitt 1,6 und liegt damit höher, als bei Frauen mit einem Durchschnittswert von 1,2, wie in Diagramm 1 zu erkennen ist.

Die Verteilung der einzelnen Scores gibt das Diagramm 2 wider:

14/35 (40%) der männlichen Proben haben den Score 0, 6/35 (17%) den Score 1, 4/35 (11%) den Score 2, 3/35 (9%) den Score 3 und 8/35 (23%) den Score 4.

8/13 (62%) der weiblichen Proben haben den Score 0, 1/13 (8%) den Score 1, 1/13 (8%) den Score 2 und 3/13 (23%) den Score 4.

Zusammenfassend kann man beobachten, dass bei Männern der Score 0 seltener vorkommt und die Scores 1, 2 und 3 deutlich öfter vertreten sind als bei Frauen. Der Score 4 hingegen ist geschlechtsunabhängig zu gleichen Anteilen vertreten.

Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten ($p=0,327$) Unterschied zwischen den Geschlechtern.

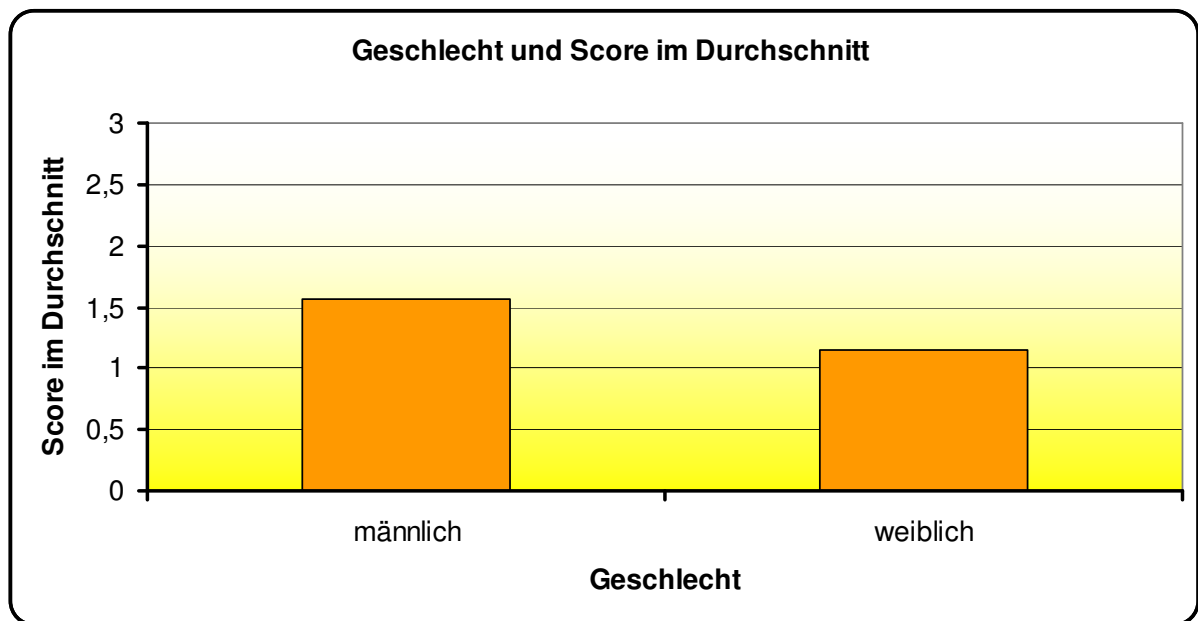


Diagramm1

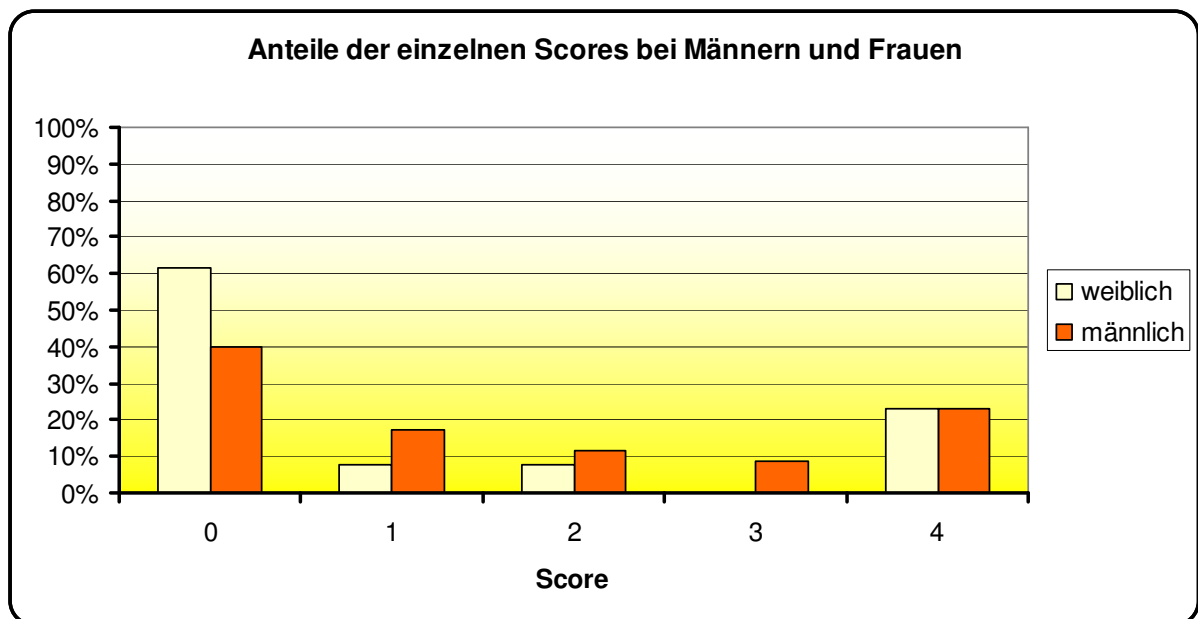


Diagramm 2

3.3. Korrelation des Scores mit dem Alter der Patienten

Um die Scores mit dem Alter korrelieren zu können, wird das Patientenkollektiv, wie in Tabelle 5 dargestellt, in 3 Altersgruppen eingeteilt. Altersgruppe 1 fasst die 30-50 jährigen, Altersgruppe 2 die 50-70 jährigen und Altersgruppe 3 die 70-100 jährigen Patienten zusammen.

In der Altersgruppe 1 liegt der durchschnittliche Score bei 1, in der Altersgruppe 2 bei 1,6 und in der Altersgruppe 3 bei 1,8 (siehe Diagramm 3).

Die Verteilung der einzelnen Scores ist in Diagramm 4 dargestellt: In der Altersgruppe 1 kommt Score 0 in 7/11 (64%), Score 1 in 2/11 (18%), Score 2 in 1/11 (9%) und Score 3 ebenfalls in 1/11 (9%) Fällen vor. In der Altersgruppe 2 kommt Score 0 in 10/21 (48%), Score 1 in 1/21 (5%), Score 2 in 3/21 (14%), Score 3 in 1/21 (5%) und Score 4 in 6/21 (28%) Fällen vor. In der Altersgruppe 3 kommt Score 0 in 5/16 (31%), Score 1 in 4/16 (25%), Score 2 in 1/16 (6%), Score 3 ebenfalls in 1/16 (6%) und Score 4 in 5/16 (31%) Fällen vor.

Auffällig ist, dass mit steigendem Patientenalter der Score 0 weniger oft vorkommt und gleichzeitig der Score 4 häufiger vorkommt. In der Altersgruppe 1 ist Score 4 gar nicht vertreten. Die Scores 1, 2 und 3 weisen keine wesentlichen Unterschiede in ihrer Verteilung auf.

Folglich steigt der durchschnittliche Score mit zunehmendem Patientenalter.

Altersgruppe	Patientenalter in Jahren
1	30-50
2	50-70
3	70-100

Tabelle 5:

Einteilung der Patienten in Altersgruppen

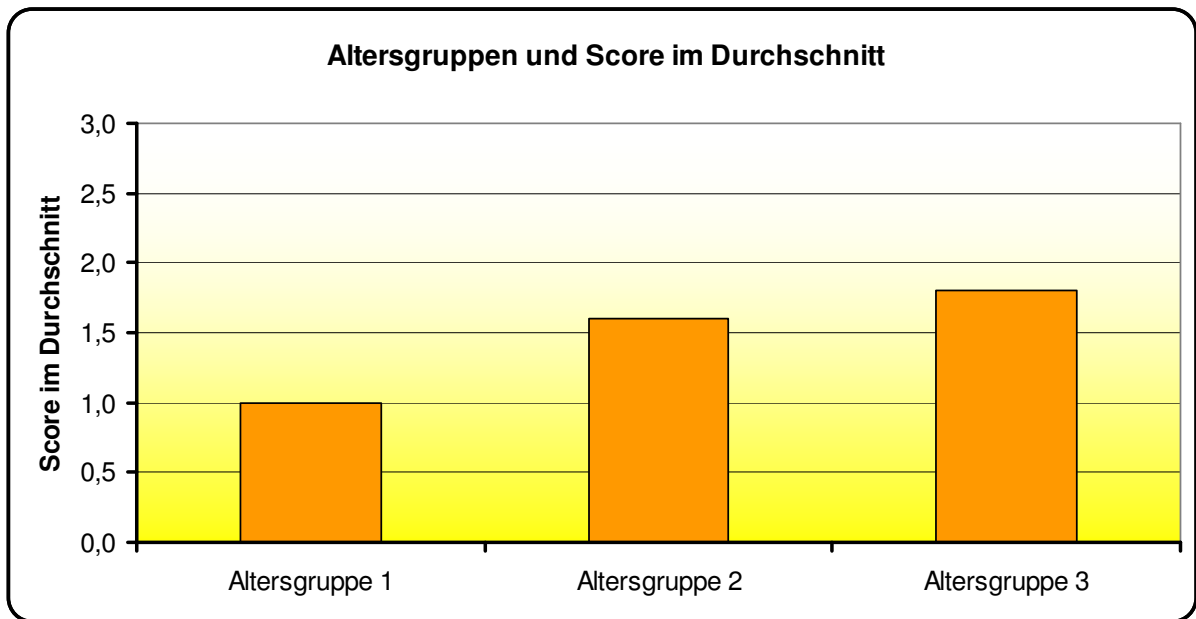


Diagramm 3

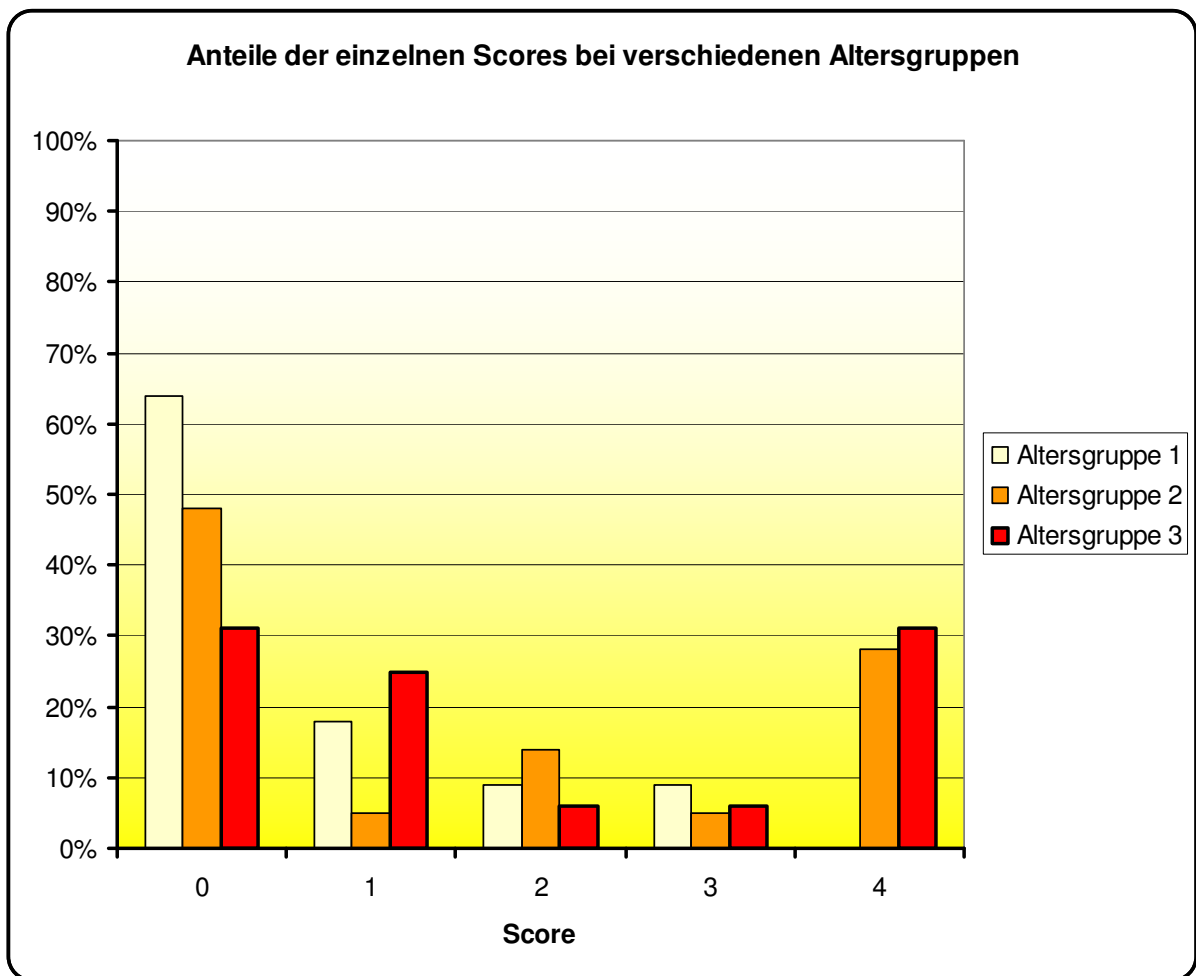


Diagramm 4

3.4. Korrelation des Scores mit dem Entdifferenzierungsgrad des Tumors

Wie in Diagramm 5 ersichtlich ist, beträgt der Score bei gut differenzierten Tumoren (G1) durchschnittlich 1, bei mäßig differenzierten (G2) 1,3 und bei schlecht differenzierten (G3) 2,5.

Bei G1 Tumoren tritt Score 0 in 3/6 (50%), Score 1 in 2/6 Fällen (33%) und Score 4 in 1/6 Fällen (17%) auf.

Bei G2 Tumoren tritt Score 0 in 18/34 (53%), Score 1 in 4/34 (12%), Score 2 in 3/34 (9%), Score 3 in 2/34 (6%) und Score 4 in 7/34 (20%) Fällen auf.

Bei G3 Tumoren tritt Score 0 in 1/8 (12,5%), Score 1 in 1/8 (12,5%), Score 2 in 2/8 (25%), Score 3 in 1/8 (12,5%) und Score 4 in 3/8 (37,5%) Fällen auf.

Diese Daten sind in Diagramm 6 veranschaulicht.

Bei G1 Tumoren kommt hauptsächlich Score 0 und 1 vor. Score 4 ist bei G1 Tumoren im Vergleich zu G2 Tumoren relativ stark vertreten.

Bei G2 Tumoren kommt hauptsächlich Score 0 vor. Die restlichen Scores kommen zu einem sehr viel kleineren und ihrer Reihenfolge nach abnehmendem Prozentsatz vor.

Bei G3 Tumoren ist Score 4 am häufigsten und die anderen Scores sind zu ähnlichen Anteilen vertreten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Score umso höher wird, desto entdifferenzierter das Tumorgewebe ist.

Die statistische Analyse ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p=0,532$) zwischen den einzelnen Entdifferenzierungsstadien.

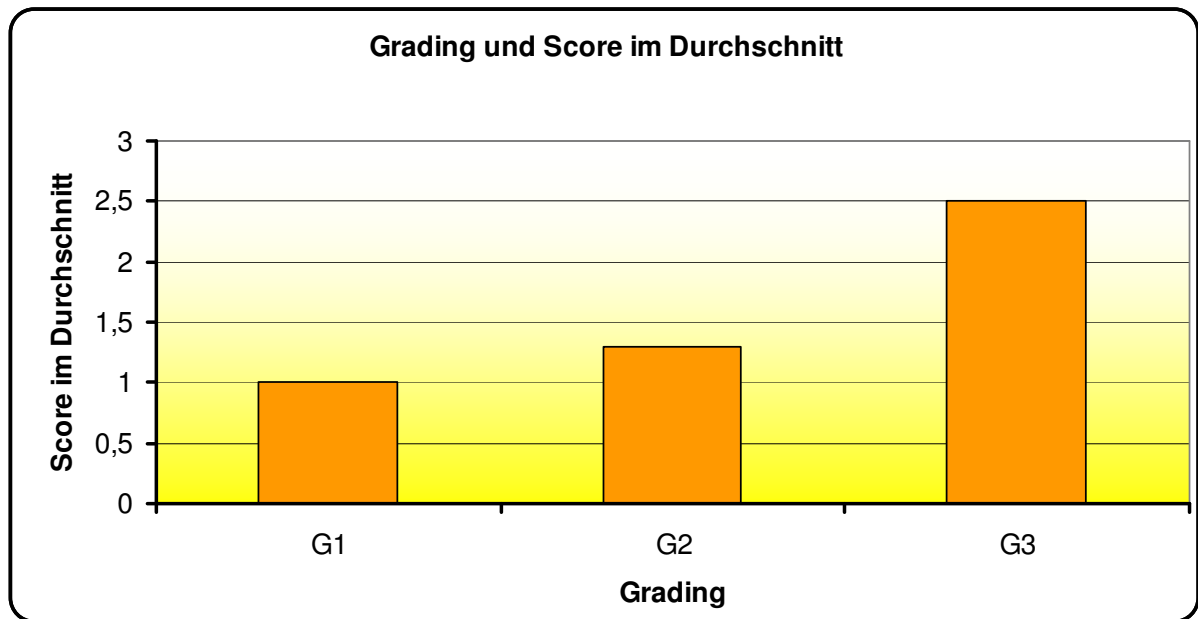


Diagramm 5

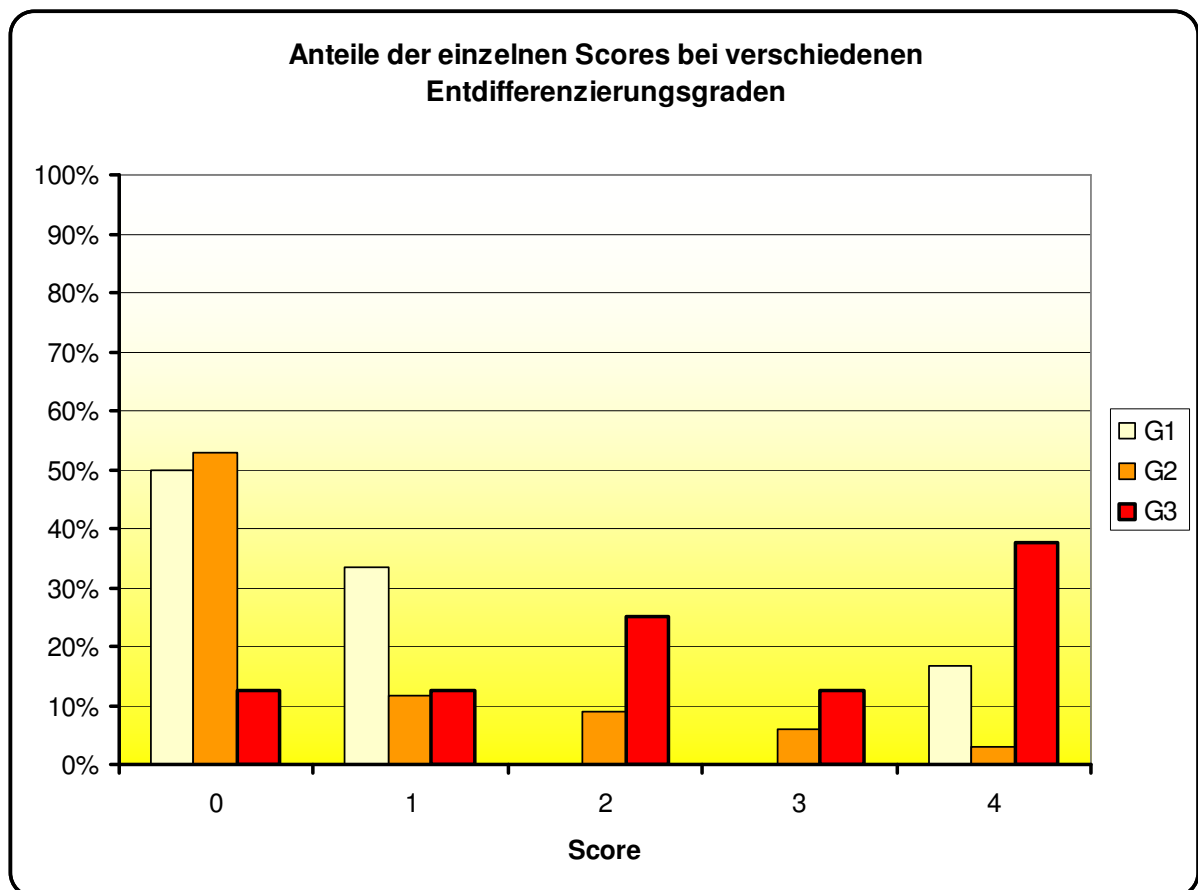


Diagramm 6

3.5. Korrelation des Scores mit der pT-Klassifikation

Die Anteile der einzelnen Scores bei den jeweiligen pT-Klassifikationen sind aus Diagramm 7 ersichtlich:

14/28 (50%) pT1-Tumoren sind 57 B positiv.

Dabei kommt Score 1 in 4/28 (14%), Score 2 in 3/28 (11%), Score 3 in 1/28 (4%) und Score 4 in 6/28 (21%) Fällen vor.

3/6 pT2-Tumoren (50%) sind 57B positiv.

Dabei kommt Score 2 in 1/6 (17%) und Score 4 in 2/6 (33%) Fällen vor.

2/4 (50%) pT3-Tumoren sind 57B positiv.

Dabei kommen Score 2 und Score 4 jeweils in 1/4 (25%) Fällen vor.

6/9 (75%) pT4a-Tumoren sind 57B positiv.

Dabei kommen Score 1, Score 3 und Score 4 in jeweils 2/9 (22%) Fällen vor.

Der einzige pT4b-Tumor ist 57B positiv (100%) und hat den Score 1.

Der durchschnittliche Score ist bei pT1-Tumoren 1,3, bei pT2-Tumoren 1,7, bei pT3-Tumoren 1,5, bei pT4a-Tumoren 1,8 und bei dem pT4b-Tumor 1. Die Werte der pT3-Tumoren und des pT4b-Tumors passen nicht in die aufsteigende Reihe der durchschnittlichen Scores. Dies könnte mit der geringen Anzahl der Proben in diesen beiden Gruppen, die die richtige Berechnung schwierig macht, zusammenhängen.

Fasst man die Tumoren ohne Infiltration der Nachbarstrukturen (pT1+pT2+pT3) zusammen, erhält man einen durchschnittlichen Score von 1,4.

Fasst man die Tumoren mit Infiltration der Nachbarstrukturen (pT4a+pT4b) zusammen, erhält man einen durchschnittlichen Score von 1,7.

Diese Zahlen sind in Diagramm 8 veranschaulicht.

Im Einzelnen sind die Unterschiede in der Scoreverteilung bei Tumoren mit und ohne Infiltration in die Nachbargewebe in Diagramm 9 dargestellt:

19/37 (51%) Tumoren, die nicht in Nachbarstrukturen infiltrieren, sind 57B positiv.

Dabei kommt Score 1 in 4/37 (11%), Score 2 in 5/37 (14%), Score 3 in 1/37 (3%) und Score 4 in 9/37 (24%) Fällen vor.

7/10 (70%) Tumoren, die in die Nachbarstrukturen infiltrieren, sind 57B positiv.

Dabei kommt Score 1 in 3/10 (30%), Score 3 in 2/10 (20%) und Score 4 in 2/10 (20%) Fällen vor.

Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede ($p=0,889$) für die einzelnen pT-Gruppen.

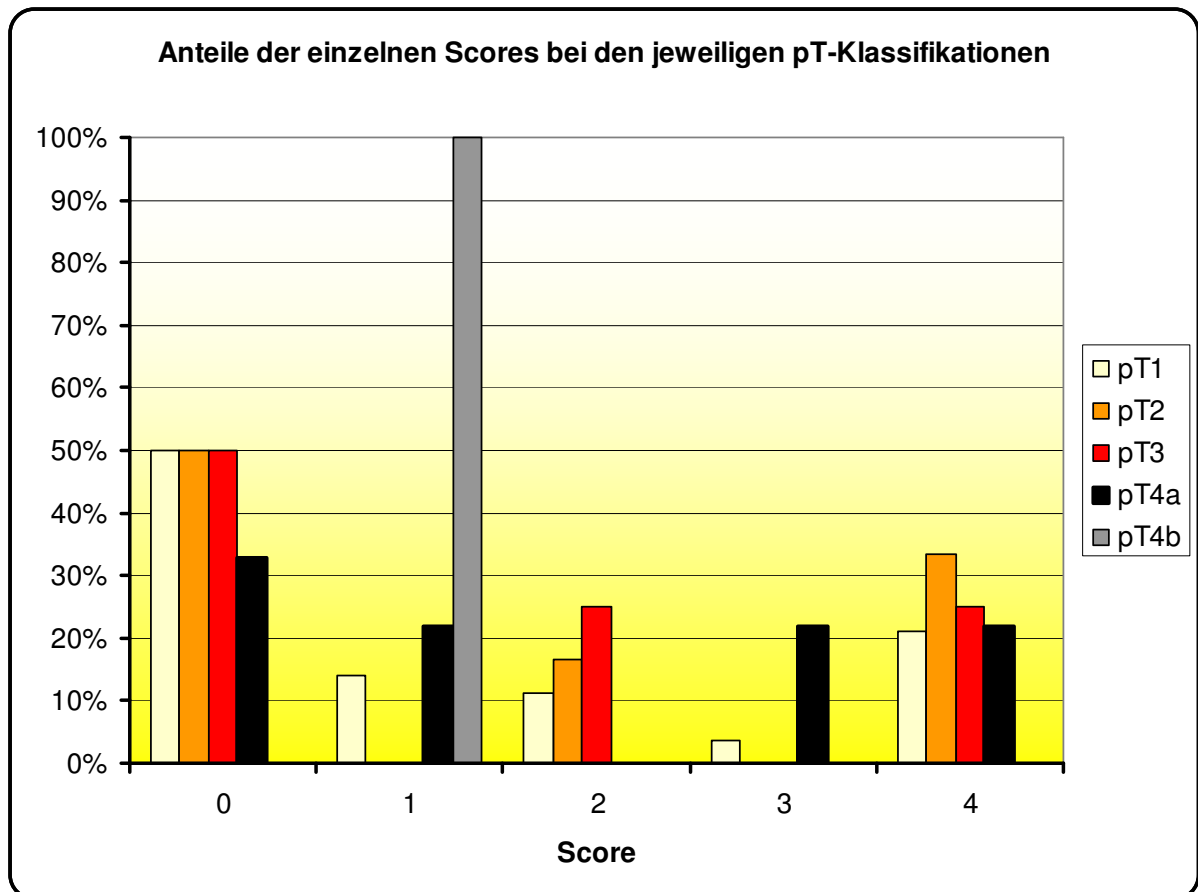


Diagramm 7

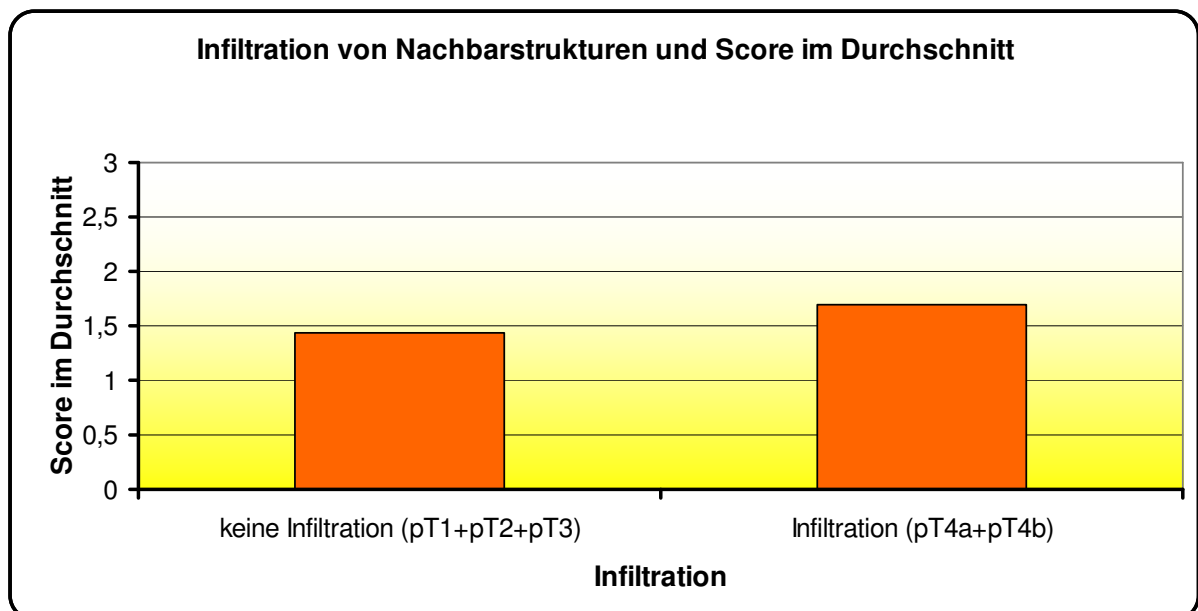


Diagramm 8

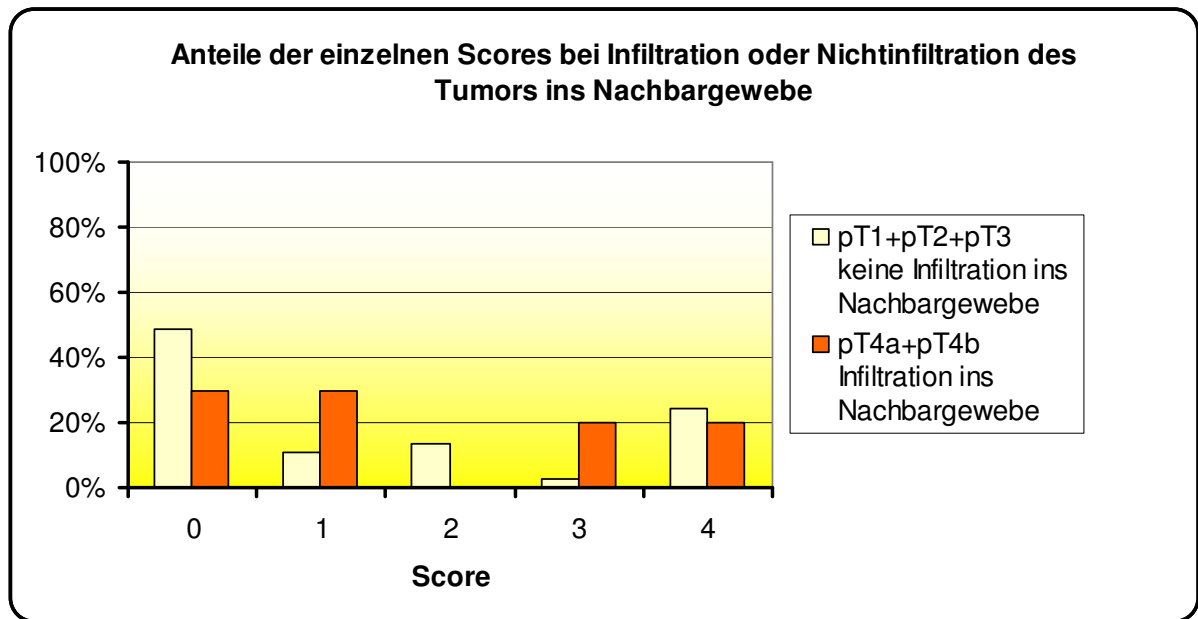


Diagramm 9

3.6. Korrelation des Scores mit der Lokalisation des Tumors

Die Tumorlokalisationen wurden zur näheren Analyse in 3 Gruppen zusammengefasst:
Mundschleimhaut, Lippen und Haut, Zunge.

Vergleicht man die Tumoren der Lippen und der Haut mit denen der intraoralen Schleimhaut, so stellt man eine sehr ähnliche Verteilung der Scores fest.

Bei den Tumoren der Mundschleimhaut lässt sich folgende Scoreverteilung beobachten:

Score 0: 14/34 (41%), Score 1: 6/34 (17%), Score 2: 4/34 (12%), Score 3: 3/34 (9%), Score 4: 7/34 (21%).

Die Scores der Tumoren der Lippen und der Haut sind folgendermaßen verteilt:

Score 0: 5/10 (50%), Score 1: 1/10 (10%), Score 2: 1/10 (10%), Score 4: 3/10 (30%).

Für die beiden Lokalisationsgruppen lässt sich der gleiche Durchschnittsscore von 1,5 berechnen.

Nur 4 Tumoren befanden sich im Bereich der Zunge. Dabei kommt Score 0 in 3/4 (75%) und Score 4 in 1/4 (25%) Fällen vor. Eine Aussage über diese Lokalisationsgruppe ist hinsichtlich der niedrigen Fallzahlen schwierig.

Die einzelnen Daten sind in Diagramm 10 zusammengefasst.

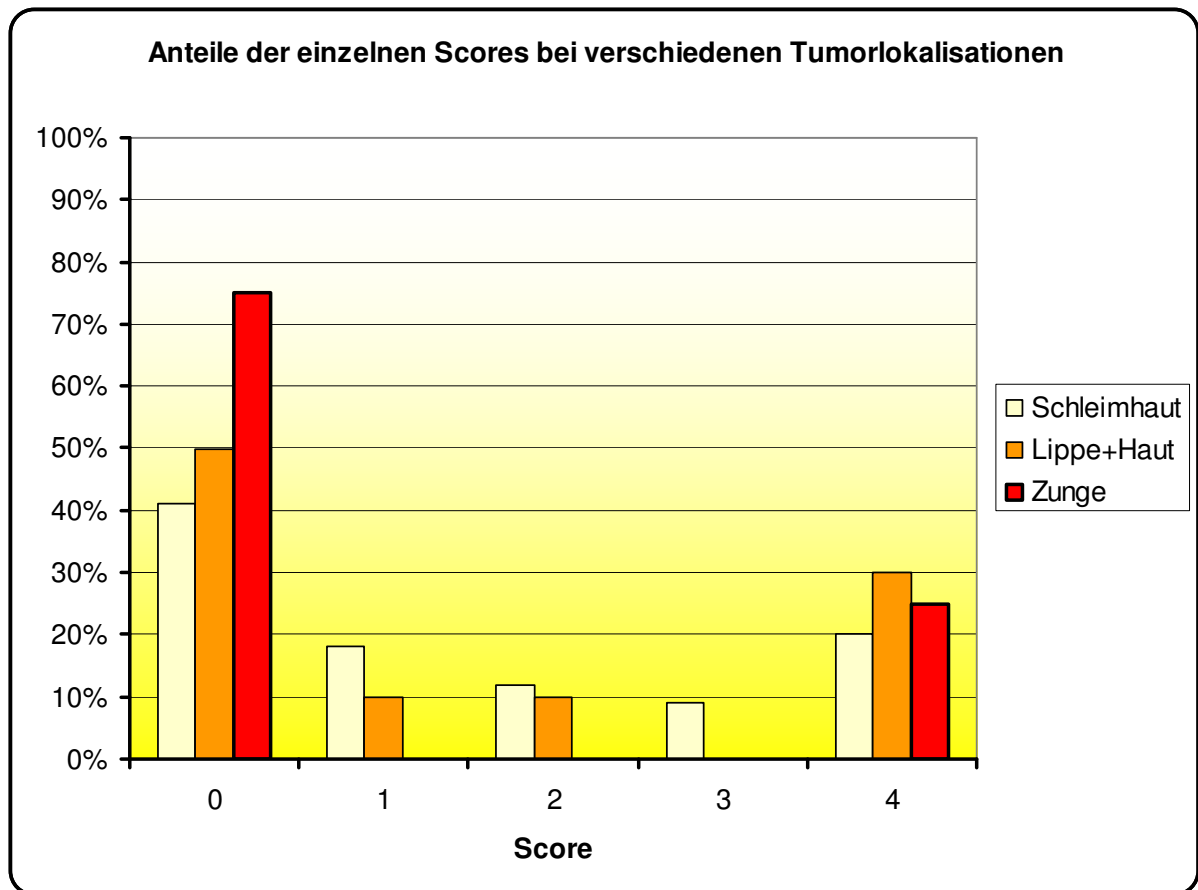


Diagramm 10

3.7. Korrelation des Scores mit den Risikofaktoren des Patienten

Wie auch in Diagramm 11 ersichtlich ist, stellt sich die Scoreverteilung in der Patientengruppe ohne die Risikofaktoren Rauchen und Alkohol folgendermaßen dar: Score 0: 6/15 (40%), Score 1: 3/15 (20%), Score 2: 1/15 (7%), Score 4: 5/15 (33%).

Der Durchschnittsscore liegt bei 1,7 (siehe Diagramm 12).

Die Scores der Patientengruppe, die mindestens einen der beiden Risikofaktoren mitbringen sind ebenfalls in Diagramm 11 dargestellt und verteilen sich wie folgt: Score 0: 16/33 (48%), Score 1: 4/33 (12%), Score 2: 4/33 (12%), Score 3: 3/33 (9%), Score 4: 6/33 (18%).

Der Durchschnittsscore liegt bei 1,4 (siehe Diagramm 12).

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Scoreverteilung und der Präsenz von Risikofaktoren lässt sich nicht feststellen.

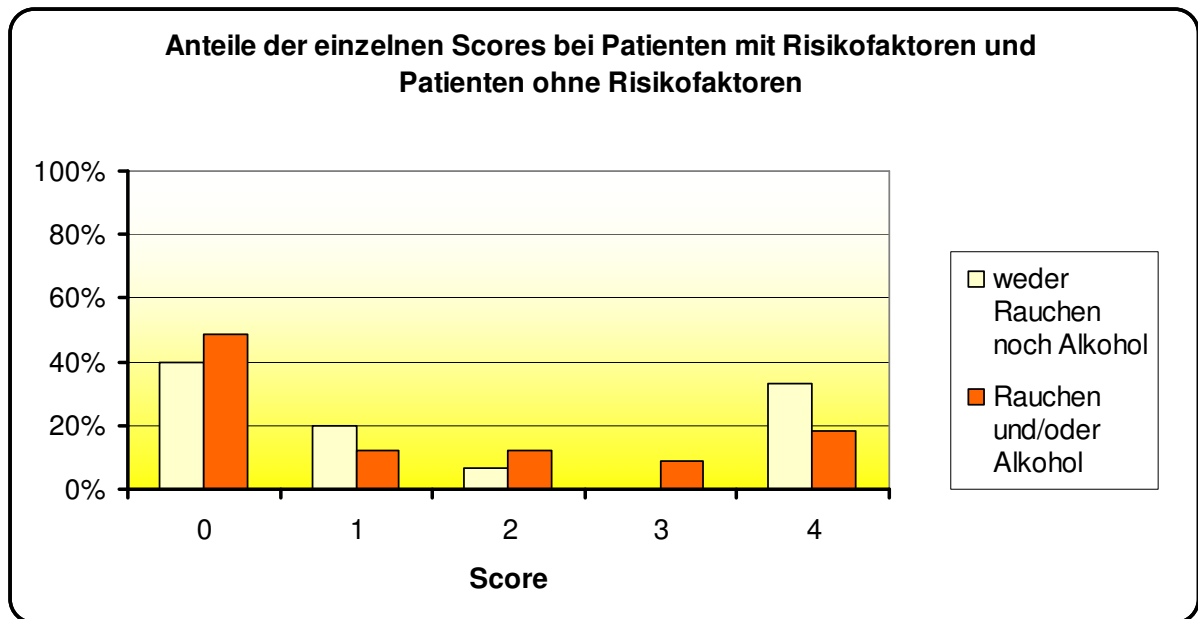


Diagramm 11

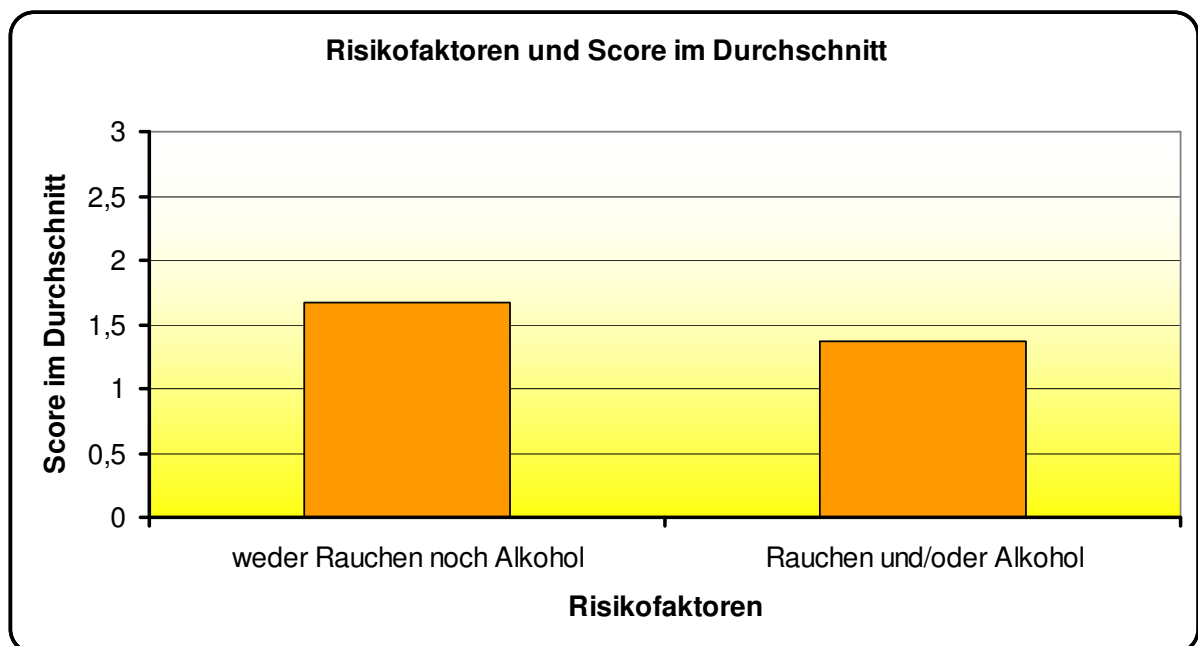


Diagramm 12

3.8. Korrelation des Scores mit anderen Tumorerkrankungen

Wie aus Diagramm 13 hervorgeht, ist die Scoreverteilung in Abhängigkeit des Vorhandenseins anderer Tumorerkrankungen, deren Lokalisation und deren zeitlichem Auftreten heterogen und ohne eindeutig signifikantes Ergebnis.

Liegt kein anderes Tumorgeschehen vor, so errechnet sich ein durchschnittlicher Score von 1,8. Bei Patienten mit früheren oder synchronen anderen Tumorgeschehen liegt der Durchschnittsscore bei 1,4.

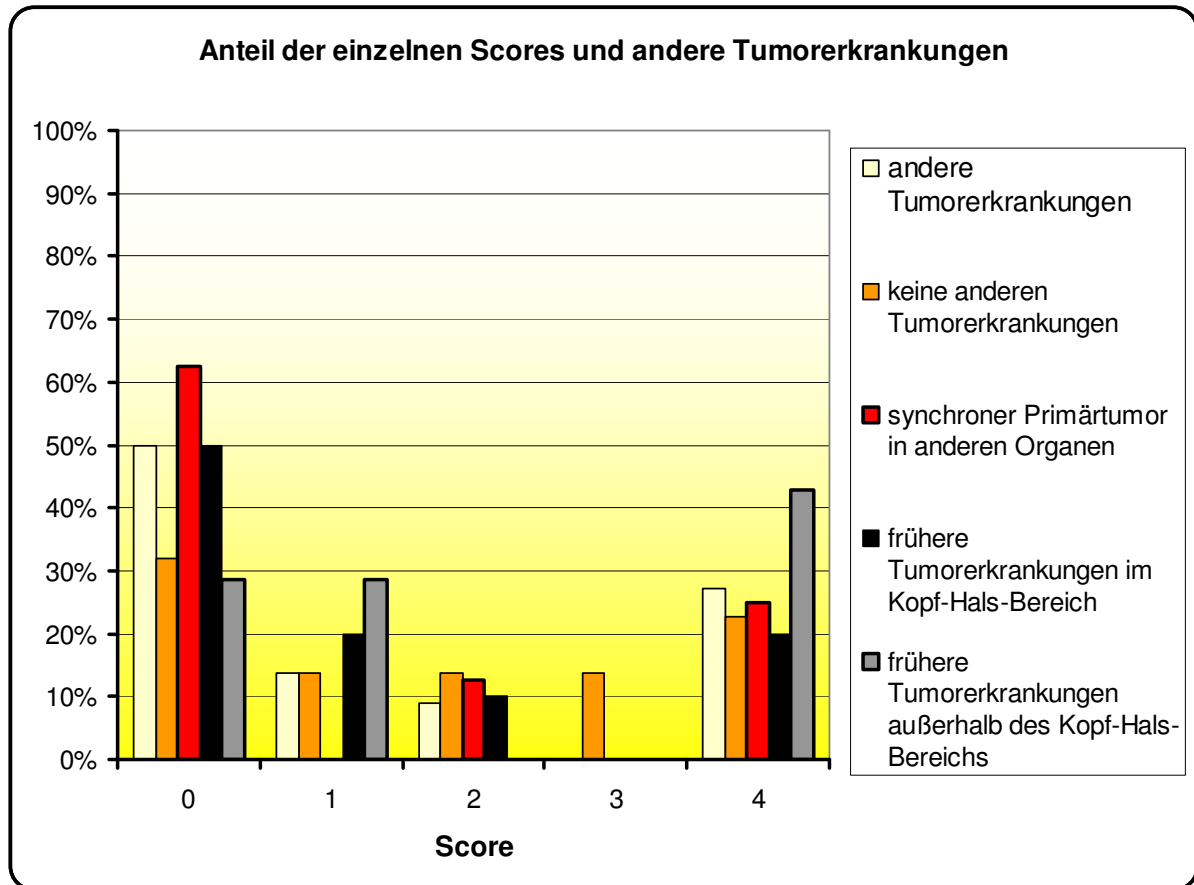


Diagramm 13

3.9. Korrelation des Scores mit der pN-Klassifikation

Die Anzahl der Patienten in den einzelnen pN-Klassen ist sehr klein.

Bei 20/48 (42%) Patienten wurde der Hals nicht operativ untersucht.

Die Verteilung der einzelnen Scores stellt sich wie folgt dar und ist in Diagramm 14 veranschaulicht:

pN0: Score 0: 10/20 (50%), Score 1: 4/20 (20%), Score 2: 2/20 (10%), Score 4: 4/20 (20%);

pN1: Score 2: 1/2 (50%), Score 4: 1/2 (50%);

pN2b: Score 0: 2/4 (50%), Score 1: 1/4 (25%), Score 4: 1/4 (25%);

pN2c: Score 0: 1/2 (50%), Score 3: 1/2 (50%).

Auffällig ist, dass alle pN1-Proben positiv für 57B sind, während die Proben aller anderen pN-Klassen jeweils nur zur Hälfte positiv für 57B sind.

Folglich fällt auch der Durchschnittsscore von pN1 aus der Reihe. Er beträgt 3, der von pN0 1,2, der von pN2b 1,25, und der von pN2c 1,5.

Fasst man die Patienten mit pN1-, pN2b- und pN2c-Hals zusammen, erhält man die Patientengruppe mit Lymphknotenmetastasierung, also mit pN+-Hals.

Hier ist die Scoreverteilung folgende: Score 0: 3/8 (37,5%), Score 1: 1/8 (12,5%), Score 2: 1/8 (12,5%), Score 3: 1/8 (12,5%), Score 4: 2/8 (25%).

Diese Zahlen werden in Diagramm 15 mit denen der Patienten ohne Lymphknotenmetastasen, also mit einem pN0-Hals, verglichen.

Es ist zu erkennen, dass bei pN0-Hälsen die niedrigeren Scores häufiger vertreten sind und die höheren Scores öfter bei pN+-Hälsen vorkommen.

Die gleiche Beobachtung wird auch in Diagramm 16, bei der Betrachtung der durchschnittlichen Scores von 1,2 bei pN0-Hals und 1,75 bei pN+-Hals, deutlich.

Diagramm 17 hebt nochmals den herausragend hohen Durchschnittsscore von pN1-Proben im Vergleich zu pN0- und pN+-Proben hervor.

Für die statistische Analyse wurden die pN-Stadien in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich pN+ und pN0. Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede ($p=0,432$) zwischen den pN0- und pN+-Tumoren.

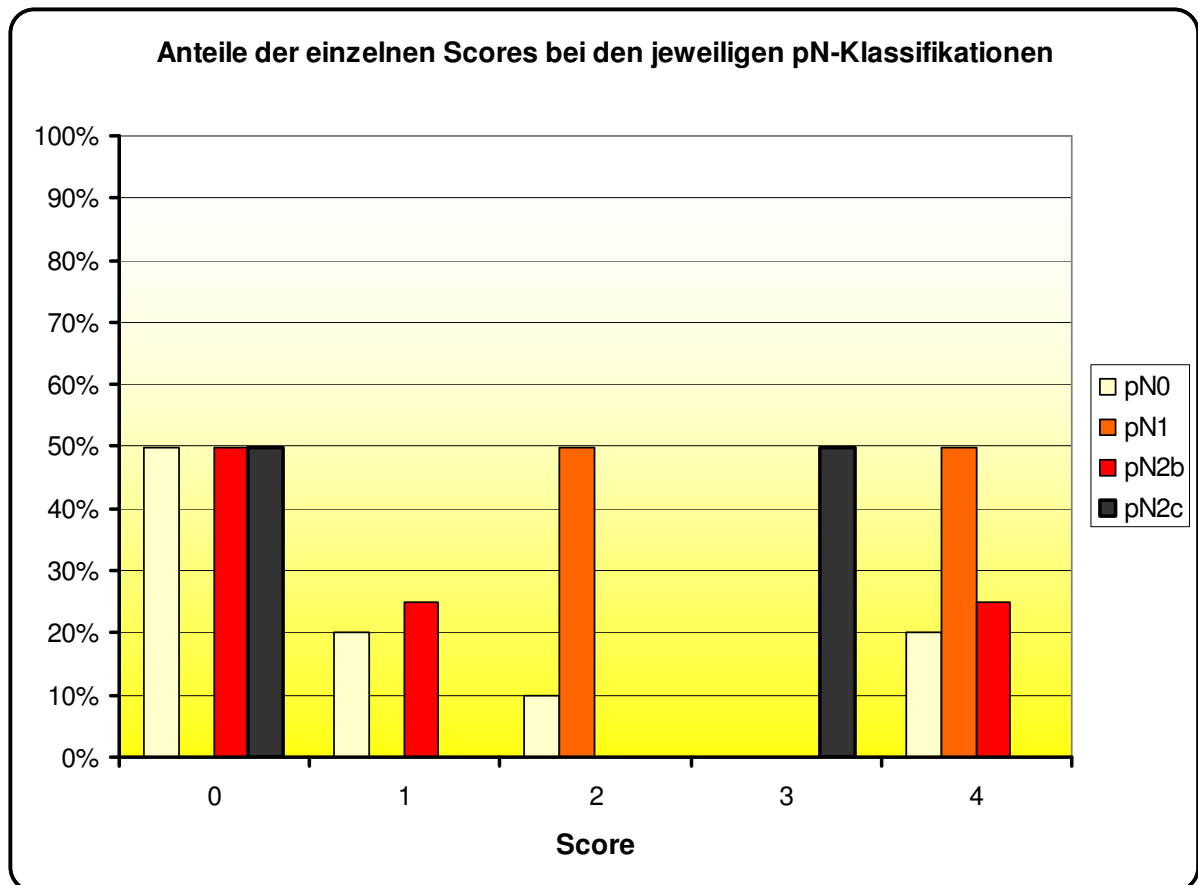


Diagramm 14

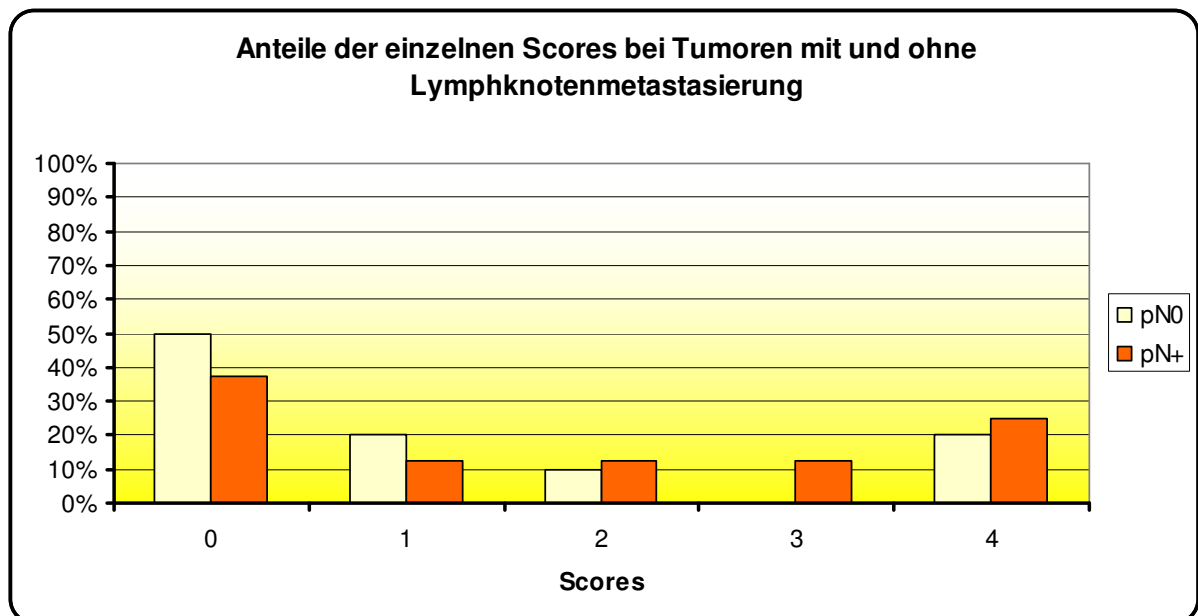


Diagramm 15

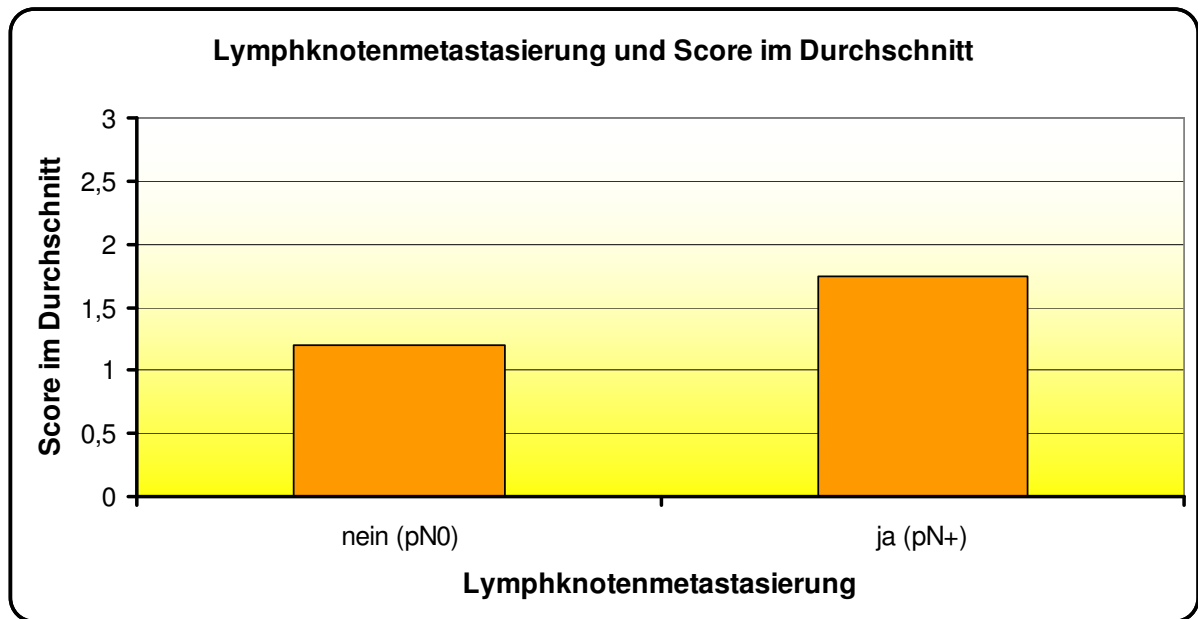


Diagramm 16

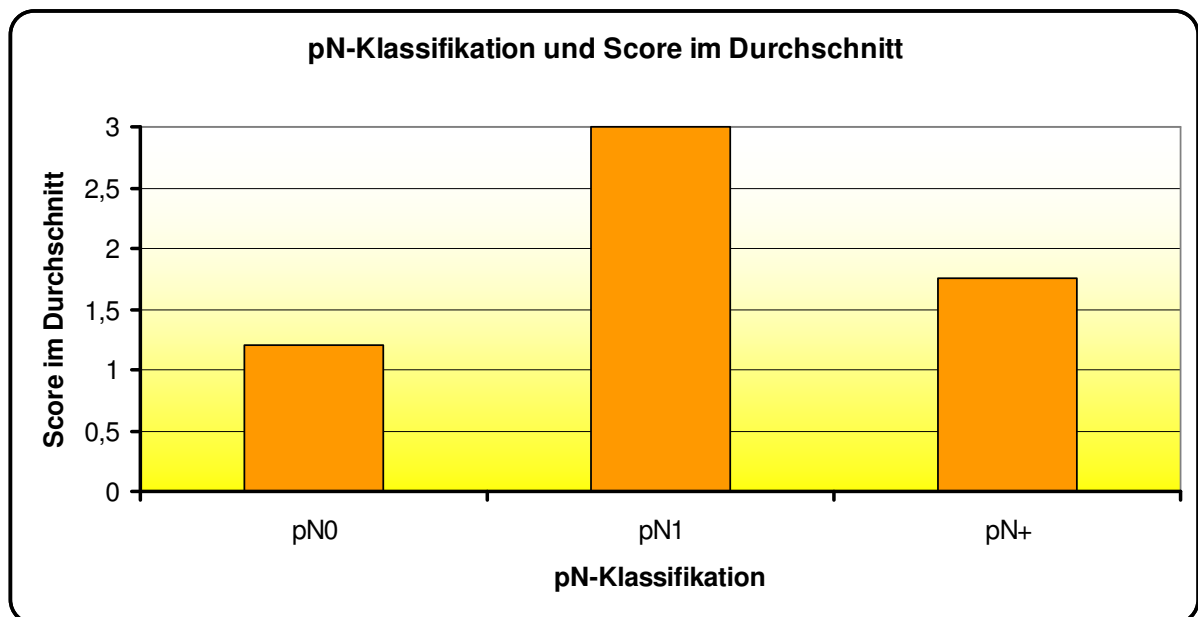


Diagramm 17

3.10. Korrelation des Scores mit der Tumorhistologie

In Diagramm 18 ist die Scoreverteilung bei nicht verhornenden und verhornenden PEC dargestellt.

Bei nicht verhornenden PEC kommt Score 0 in 10/25 (40%), Score 1 in 6/25 (24%), Score 2 in 2/25 (8%), Score 3 in 3/25 (12%) und Score 4 in 4/25 (16%) Fällen vor.

Bei verhornenden PEC kommt Score 0 in 11/22 (50%), Score 1 in 1/22 (5%), Score 2 in 3/22 (13%) und Score 4 in 7/22 (32%) Fällen vor.

Der durchschnittliche Score der nicht verhornenden PEC von 1,3 ist in Diagramm 19 gegen den durchschnittlichen Score der verhornenden PEC von 1,6 aufgetragen.

Die Expression von MAGE-A-Antigenen ist bei den verhornenden PEC stärker als bei den nicht verhornenden.

Bei einer Probe handelt es sich um ein Carcinoma-in-situ (CIS). Diese war negativ für 57B.

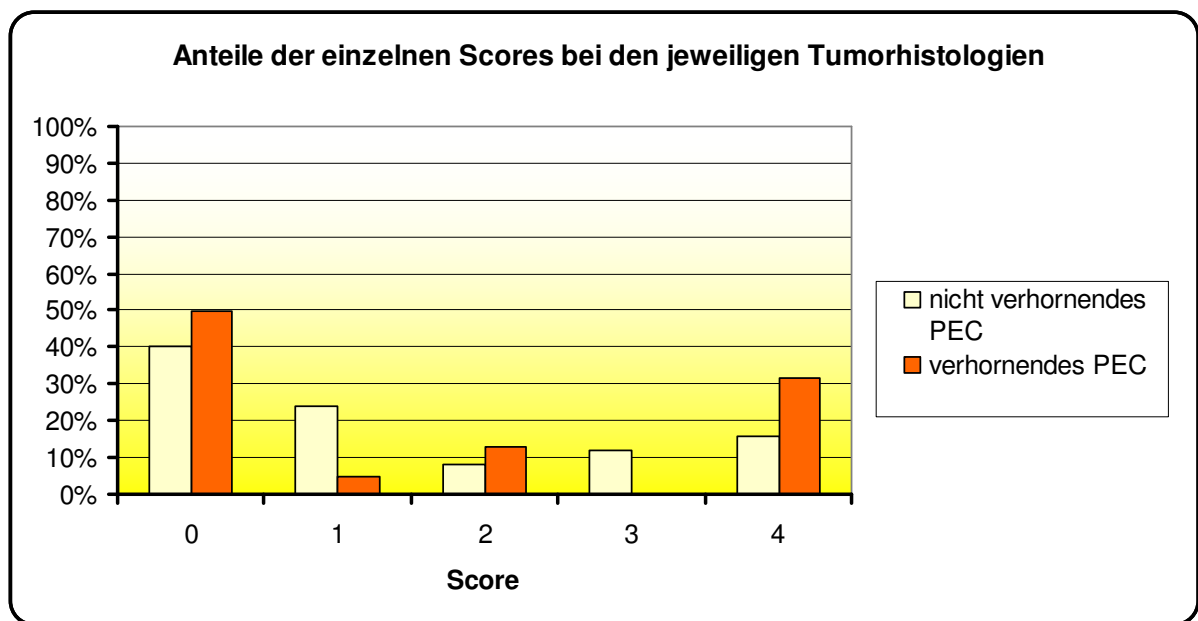


Diagramm 18

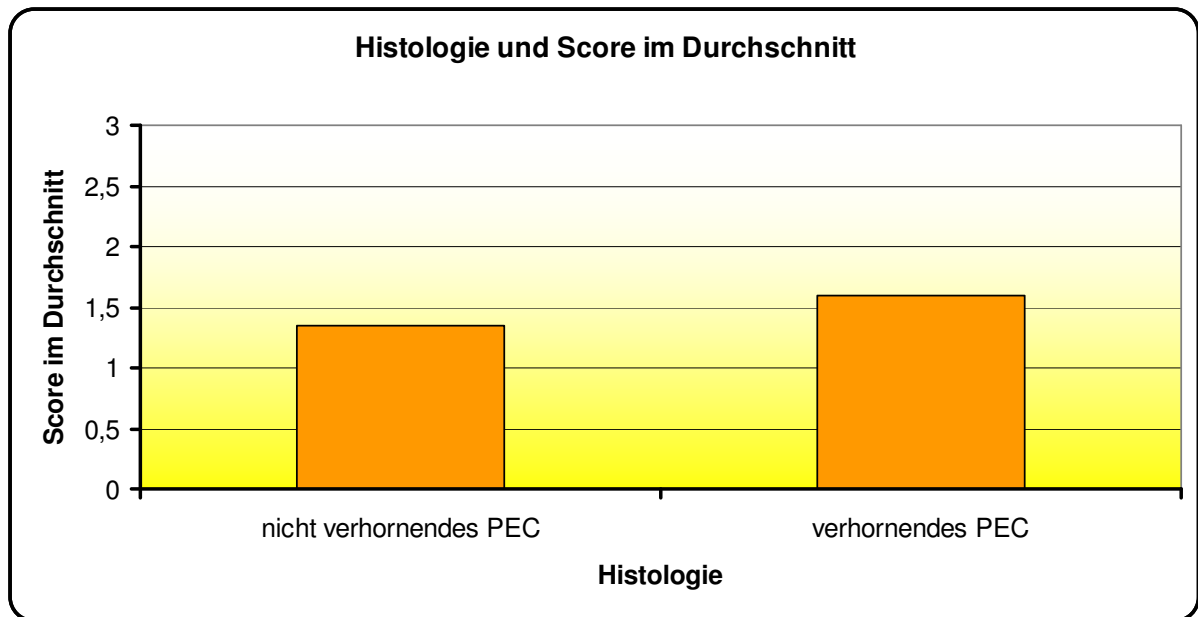


Diagramm 19

Die Abbildungen 4 bis 7 zeigen das Färbemuster von Tumoren verschiedener Entdifferenzierungsgrade und verschiedener Größe:

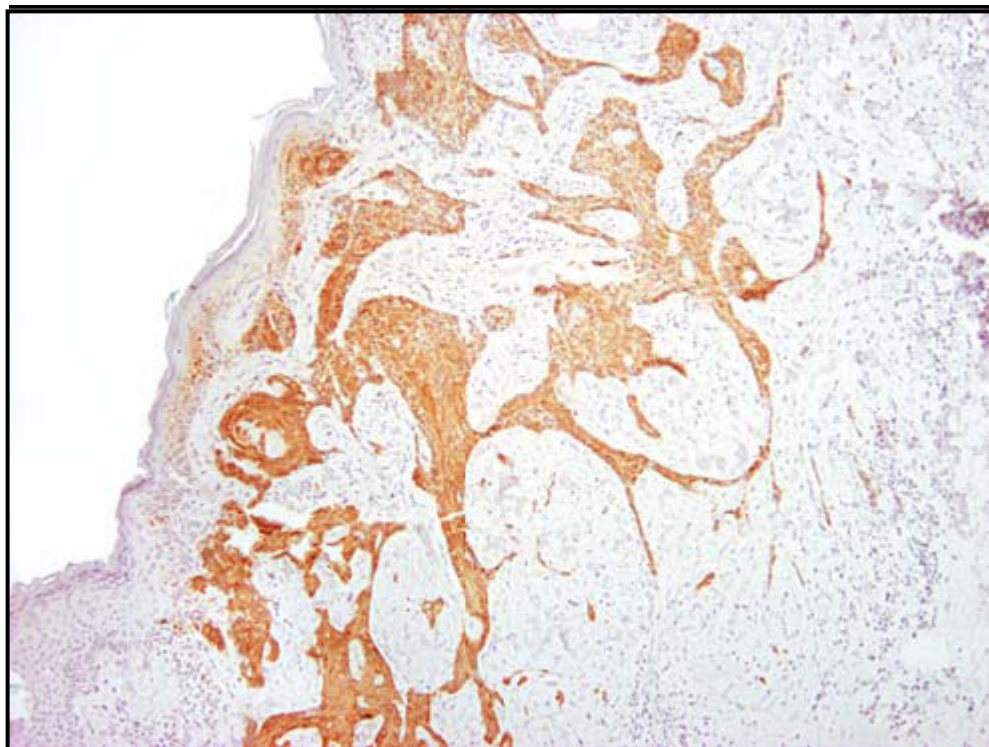


Abbildung 4:

Anfärbung eines pT1 G2 oralen Plattenepithelkarzinoms mit dem globalen MAGE-A Antikörper 57B (x100)

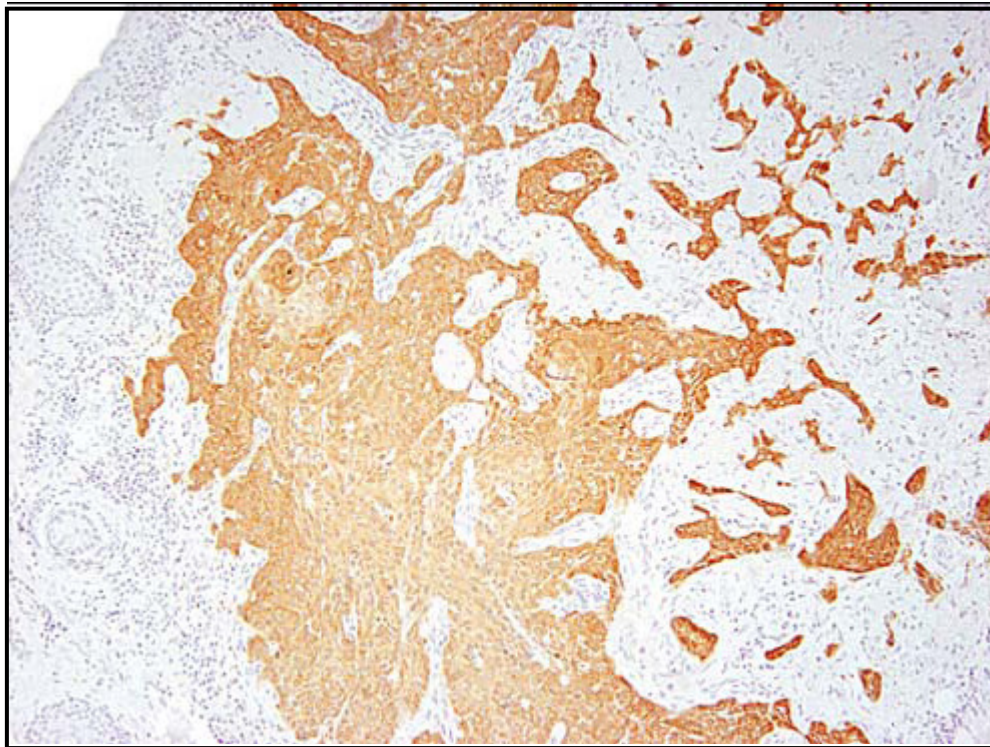


Abbildung 5:

Anfärbung eines pT1 G1 L0 V0 oralen Plattenepithelkarzinoms mit dem globalen MAGE-A Antikörper 57B (x100)

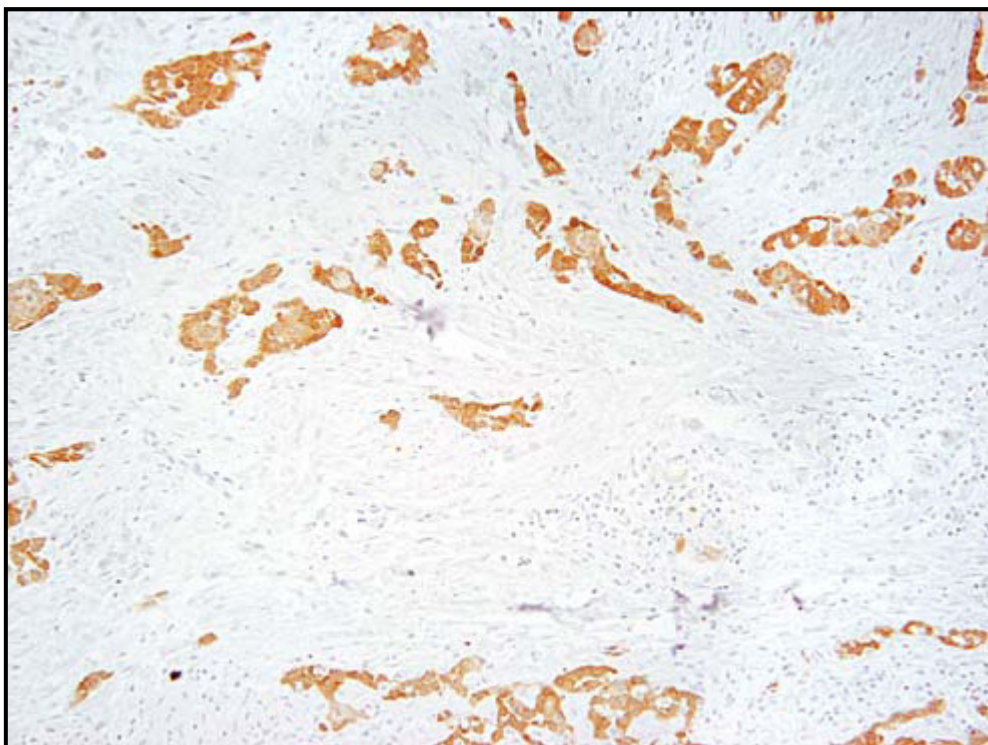


Abbildung 6:

Anfärbung eines pT1 G3 L1 V0 oral Plattenepithelkarzinoms mit dem globalen MAGE-A Antikörper 57B (x100)



Abbildung 7:

Anfärbung eines pT3 G2 L0 V0 oralen Plattenepithelkarzinoms mit dem globalen MAGE-A Antikörper 57B (x100)

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Autoren

Die statistische Auswertung mittels nicht parametrischer Tests ergab bei allen Merkmalen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen.

Generell sollten an dieser Stelle aber nicht mögliche signifikante Ergebnisse ausgeschlossen werden. Da sich z.B. die pT-Klassifikation in 5 verschiedene Untergruppen aufspaltet, ist das untersuchte Patientenkollektiv in einigen Untergruppen sehr klein. Größere Fallzahlen in den einzelnen untersuchten Untergruppen würden zuverlässigere Ergebnisse liefern. Nichtsdestotrotz sind Tendenzen der Korrelation der Expression der MAGE-A-Antigene mit den klinischen Parametern zu beobachten, die auch in Vergleichsstudien anderer Autoren gefunden werden können.

4.1.1. Expressionsmuster der MAGE-A Antigene

Die Expressionshäufigkeit der einzelnen CT-Antigene variiert in unterschiedlichen Tumortypen aber auch innerhalb eines Tumortyps [37].

In stark durch 57B angefärbten Tumorgebieten, gibt es Inseln von nicht angefärbten Zellen, und in Tumorgebieten die zum Großteil nicht 57B positiv sind finden sich kleine Inseln 57B-positiver Zellen [67].

In der vorliegenden Arbeit sind 54% der Proben positiv für den Antikörper 57B.

Studien die sich der PCR bedienen, berichten von höheren Zahlen: In zwei verschiedenen Studien von Ries et al. (2005 und 2008) exprimieren 71% [41] bzw. 85,45% [68] der untersuchten PEC MAGE-Antigene und Figueiredo et al. berichten 2006 im gleichen Zusammenhang von 66,6% [69].

Laut Eura M. et al. exprimieren 1995 71% der untersuchten PEC des Kopf- und Halsbereichs mindestens einen Vertreter der MAGE A [42].

Kienstra et al. beschrieben 2003 60% 57B positive PEC im Kopf- und Halsbereich durch PCR und weniger als 60% durch die immunhistochemische Methode bei der Betrachtung derselben Karzinome [70]. Sie vermuten, dass die Abkopplung von Transkription und Translation, die geringere Sensitivität des Antikörpers zur immunhistochemischen Methode als zur PCR und

die Heterogenität der MAGE-Expression Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnten [70].

Jehle erreichte 2007 in 60% der 33 untersuchten Tumorproben eine Anfärbung mit mAb-57B [71].

4.1.2. Korrelation des Scores mit dem Geschlecht der Patienten

In dieser Studie beträgt der durchschnittliche Score bei Proben, die von Männern stammen, 1,6 und liegt höher als bei Proben, die von Frauen stammen, und einen durchschnittlichen Score von 1,2 besitzen.

In einer Studie, die sich mit der Expression des C/T-Antigens NY-ESO-1 im Urothelkarzinom befasst, konnte keine Korrelation zwischen der Expressionshäufigkeit und dem Geschlecht der Patienten gefunden werden [72] und auch für die Anzahl der pro Probe exprimierten CT-Antigene im PEC der Kopf- und Halsregion konnte kein Zusammenhang zu dem Geschlecht der Patienten hergestellt werden [73].

In der vorliegenden Studie ist der Anteil der Frauen am Patientenkollektiv, das frei von den Risikofaktoren Rauchen und Alkoholkonsum ist, viel höher als der Anteil der Männer. Nur 17% (6/35) der Männer sind weder Raucher noch übermäßige Alkoholkonsumenten, während 77% (10/13) der Frauen weder Rauchen, noch Alkohol missbrauchen.

Da Alkohol- und Tabakkonsum sich negativ auf das Immunsystem auswirken, mag die Fähigkeit des Immunsystems aus eigener Kraft das Tumorgewebe zu bekämpfen bei Patienten die frei von diesen Risikofaktoren sind, höher sein. Die Immunantwort richtet sich gegen die Tumorzellen, die MAGE-Antigene exprimieren. Sie werden eliminiert. Die Areale im Tumorgewebe, die MAGE-Antigene exprimieren werden kleiner, was zu einem niedrigeren Score führt [67].

Peng et al. fanden 2005 in einer Studie des Leberzellkarzinoms keine Korrelation der Expressionshäufigkeit von CT-Antigenen und dem Geschlecht der Patienten [74].

4.1.3. Korrelation des Scores mit dem Alter der Patienten

Die Auswertung der Scores bezüglich des Patientenalter ergibt, dass mit zunehmendem Alter der Score steigt.

In zwei Studien zum Leberzellkarzinom [74, 75] wurde dem entsprechend herausgefunden, dass das Durchschnittsalter von Patienten mit CT-Antigen positiven Tumoren höher ist, als das von Patienten mit CT-Antigen negativen Tumoren.

Diese Ergebnisse hängen wahrscheinlich damit zusammen, dass das menschliche Genom im Alter allgemein hypomethylierter ist und die CT-Antigen Expression durch Hypomethylierung reguliert wird [76].

In nicht MAGE-A1 exprimierenden Tumoren konnten nämlich alle Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung des MAGE-A1 Promotors gefunden werden, MAGE-A1 wurde aber trotzdem nicht exprimiert. Wurde jedoch der Promotor demethyliert, konnte MAGE-A1 in diesen Tumoren exprimiert werden [40].

Im untersuchten Patientenkollektiv ist auch ein tendenzieller Zusammenhang zwischen dem Alter und der Tumorgroße festzustellen. Bei größeren Tumoren steigt der Altersdurchschnitt der Patienten: T1-Patienten waren im Durchschnitt 59 Jahre alt, T2-Patienten 60, T3-Patienten 63, T4a-Patienten 68 und der einzige T4b-Patient war 65 Jahre alt. Diese Tatsache wäre ebenfalls eine Erklärung für den Anstieg des Scores mit zunehmendem Patientenalter.

In einigen Studien anderer epithelialer Tumoren konnte kein Zusammenhang der MAGE-A Expression mit dem Patientenalters bestätigt werden [77, 78].

4.1.4. Korrelation des Scores mit dem Entdifferenzierungsgrad des Tumors

Ein deutliches Ergebnis ergibt die Auswertung des Scores bezüglich des Entdifferenzierungsgrades des Tumors: je entdifferenzierter das Tumorgewebe ist, desto höher wird der Score.

Derselbe Zusammenhang wird in zahlreichen Studien epithelialer Tumoren außerhalb des Kopf- und Halsbereichs beobachtet, unabhängig davon, ob sich die Studien des Nachweises von CT-Antigenen mittels Immunhistochemie oder von CT mRNA mittels PCR bedienen [72, 78-82].

Eine steigende Expressionsrate von MAGE-Genen mit zunehmender Entdifferenzierung von PEC des Kopf- und Halsbereichs konnten 1995 auch Eura M. et al. feststellen [42].

Dieses Phänomen könnte mit der „Krebs-Stammzell-Theorie“ erklärt werden. Diese Theorie besagt, dass es in Tumoren, neben normalen Tumorzellen, einen Zellpool mit Stammzeleigenschaften gibt, der auf unterschiedlichen Wegen und durch verschiedene Mutationen entstehen kann. Diese „Tumorstammzellen“ besitzen im Gegensatz zu den

anderen Tumorzellen die Fähigkeit sich selbst zu erneuern, sind entdifferenziert und für die Proliferation des Tumorgewebes zuständig. Nur ihnen wird die CT-Antigen Expression zugeschrieben. Gestützt wird diese Theorie vor allem dadurch, dass CT-Antigene im normalen Gewebe nur in der Stammzell-Selbsterneuerung und in dem frühen Stadium der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen [34, 83].

Daher ergibt sich folgender Zusammenhang: je entdifferenzierter das Tumorgewebe ist, desto mehr Tumorstammzellen sind darin enthalten und desto mehr CT-Antigene werden folglich exprimiert.

In diesem Zusammenhang sollte auch die epitheliale–mesenchymale-Transition (EMT) erwähnt werden, die mit dem Verlust der epithelialen zellulären Charakteristika und mit dem Gewinn der Migrationsfähigkeit der Zelle einhergeht. Die EMT ist ein fundamentaler Prozess in der Embryogenese, z.B. während der Gastrulation, wird in der Embryogenese sowie in der Kanzerogenese durch Wnt induziert und ist gekennzeichnet durch den Verlust von membranösem E-cadherin und damit einem Verlust der Adhäsionsfähigkeit der Zelle, was durch die Translokation von beta-catenin von der Adhäsionsstelle in den Zellkern getriggert wird [84].

Zellen, die von der EMT betroffen sind, sind ebenso entdifferenziert wie die Tumorstammzellen und Brabletz et al. schlugen 2006 die Theorie der migrierenden Tumorstammzellen (MCS) vor, die die Tumorstammzelltheorie und die EMT vereint. Die MCS sind Tumorstammzellen, die zusätzlich eine EMT erfahren haben, an der Grenze des Tumors zum normalen Gewebe lokalisiert sind und stark mit dem Auftreten von Metastasen und mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit in Verbindung gebracht werden [84]. Ries et al. (2008) und Figueiredo et al. (2006) fanden jedoch keine Korrelation des Gradings mit der Expression von MAGE im oralen PEC [68, 69]. Ein Grund dafür könnte die Amplifizierung von MAGE-Antigenen aus Subklonen der PEC durch die PCR sein, die in der vorliegenden Studie einen niedrigen Score haben [85].

Auch in einigen Studien anderer epithelialer Tumoren konnte in diesem Zusammenhang keine Korrelation gefunden werden [77, 78].

4.1.5. Korrelation des Scores mit der pT-Klassifikation

Ein Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und dem Score ist in der vorliegenden Studie tendenziell, aber nicht eindeutig erkennbar. Bei den Tumoren, die nicht in die

Nachbarstrukturen infiltrieren ist der Score durchschnittlich niedriger als bei den Tumoren, die in die Nachbarstrukturen infiltrieren. Betrachtet man die Scores für die einzelnen Tumorstadien, so steigen diese zwar eindeutig von pT1 nach pT2 und etwas nach pT4a an, pT3 und pT4b fallen aber aus der Reihe, vermutlich weil diese Tumoren zahlenmäßig zu gering vertreten sind, um ein verlässliches Ergebnis zu liefern.

Figueiredo et al fanden 2006 in ihrer Studie über die CT-Genexpression im PEC des Kopf- und Halsbereiches eine Korrelation zwischen der T-Klassifikation der Tumoren und der Expressionshäufigkeit verschiedener CT-Antigene [69].

Auch Studien anderer epithelialer Tumoren kamen zu diesem Ergebnis [78, 86, 87].

Ries et al. konnten 2008 zwar auch hier keine Korrelation finden, stellen aber fest, dass die simultane Expression mehrerer MAGE-Antigene bei fortgeschrittenem Tumorstadium zunimmt [68].

Einige Studien anderer epithelialer Tumoren können keine Korrelation des scores mit der pT-Klassifikation finden [74, 77-79].

Zu erklären wäre der steigende Score bei zunehmendem pT-Stadium sicherlich damit, dass die Hypomethylierung des Tumorgewebes im fortgeschrittenen Tumorstadium zunimmt [77, 88] und eine Demethylierung für die Expression von CT- Antigenen ausschlaggebend ist [76].

4.1.6. Korrelation des Scores mit der Lokalisation des Tumors

In dieser Studie kann keine Abhängigkeit der MAGE-A Genexpression von der Lokalisation des Tumors abgeleitet werden. Die Zahlen für die Tumoren der Mundschleimhaut und für die Tumoren der Lippen und Haut weisen keine großen Unterschiede auf, der Score ist im Durchschnitt sogar identisch und für die Zungentumoren kann im Hinblick auf ihre geringe Anzahl keine Aussage getroffen werden.

Eura M et al. beschreiben 1995 für das PEC des Kopf- und Halsbereichs eine höhere Expression von MAGE-Antigenen bei Lokalisation im Oropharynx, Hypopharynx und in den Kieferhöhlen, als bei Lokalisation im Larynx, in der Mundhöhle und auf der Zunge [42].

4.1.7. Korrelation des Scores mit den Risikofaktoren des Patienten

Figueiredo et al. konnten 2006 eine Korrelation zwischen dem Risikofaktor Rauchen bei primären PEC der Kopf- und Halsregion und der CTA-Genexpression finden [69].

In der vorliegenden Studie ist jedoch kein deutlicher Zusammenhang zwischen der Prävalenz von Risikofaktoren und der Scoreverteilung feststellbar.

Im Gegensatz zu der oben zitierten Studie ist eher eine Tendenz zu einer Erhöhung des Scores in Abwesenheit von Risikofaktoren zu beobachten.

4.1.8. Korrelation des Scores mit anderen Tumorerkrankungen

Bei Patienten mit anderen früheren oder synchronen Tumorerkrankungen liegt in dieser Studie der Score durchschnittlich etwas niedriger, als bei unvorbelasteten Patienten. Die Scores sind im Einzelnen allerdings sehr heterogen verteilt.

4.1.9. Korrelation des Scores mit der pN-Klassifikation

In der vorliegenden Studie wird in Einklang mit mehreren anderen Studien über epitheliale Tumoren außerhalb des Kopf- und Halsbereichs [78, 86, 89, 90] deutlich, dass bei Patienten mit Metastasen in den Halslymphknoten der Score durchschnittlich höher ist, als bei Patienten mit pN0-Hals. Dabei nimmt der pN1-Hals mit dem mit Abstand höchsten Durchschnittswert eine Sonderrolle ein. Die geringen Fallzahlen in den einzelnen pN-Klassen können möglicherweise das Ergebnis verzerren.

Ries et al. finden 2008 für das orale PEC auch hier keine Korrelation [68], genauso wie Heier et al. 2006 für das PEC des Ösophagus [77].

4.1.10. Korrelation des Scores mit der Tumorphistologie

Bei nicht verhornenden PEC ist in dieser Studie der Score im Durchschnitt niedriger, als bei verhornenden PEC.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu dem Ergebnis der Korrelation des Entdifferenzierungsgrades mit dem Score, das auch durch mehrere andere Studien bestätigt wird [72, 78-81], da nicht verhornende PEC entdifferenzierter sind als verhornende PEC.

4.2. Perspektiven

4.2.1. CT-Expression als Ausgangspunkt für die Immuntherapie

Anfang der 80 Jahre wurde erstmals die spezifische Interaktion von cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) mit autologen Tumorzellen in in vitro Arbeiten mit autologen Melanomsystemen beschrieben. Ein Kulturansatz aus bestrahlten Tumorzellen als Stimulatorzellen, autologen T-Lymphozyten als Responderzellen und Interleukin(IL-)-2 als Lymphozytenwachstumsfaktor lieferte beispielsweise nach 2-3 wöchiger Kulturdauer hochaktive CTL mit spezifischer lytischer Aktivität gegen autologe Tumorzellen [91, 92].

CTL können ein Antigen nur dann spezifisch erkennen, wenn es an der Tumorzelloberfläche durch ein major histocompatibility complex Molekül der Klasse I (MHC-I) präsentiert wird.

Der T-Zellrezeptor (TCR) ist in der Lage, einen Komplex aus einem MHC-I Molekül und einem Peptid aus 9-10 Aminosäuren (AS) Länge zu erkennen. Dieses Peptid entstammt einem intrazellulär prozessierten Tumorantigen und geht aufgrund seiner AS-Konstellation eine Bindung mit dem jeweiligen MHC-I ein. Es gibt individuell verschiedene MHC-I Typen und je nach gegebenem MHC-Phänotyp werden unterschiedliche Peptide aus einem tumorassoziierten Protein präsentiert [93].

Die MAGE-Peptide gehören gemäß ihrer Gewebsexpression und Entstehungsursache zu den tumorassoziierten Antigenen: Im PEC des Kopf- und Halsbereichs werden in der Literatur Expressionsraten von 60%-85% [41, 42, 67, 70] mittels PCR ermittelt. Die Expressionsrate der vorliegenden Arbeit liegt mit 54% unter den oben erwähnten Zahlen, was durch die Verwendung der immunhistochemischen Methode zu erklären ist [70]. Auch bei einer Vielzahl anderer Tumorentitäten konnte die Expression von MAGE-Antigen und anderen CT-Antigenen nachgewiesen werden [36, 37]. Die Expression der CT-Antigene, die eine Multigenfamilie bilden und deren Gencode X-chromosomal lokalisiert ist, ist, außerhalb von Tumorgewebe, weitgehend auf Keimzellgewebe begrenzt. Die CT-Genaktivierung erfolgt über DNA-Hypomethylierung bzw. Histon-Deacetylierung [37].

Die MAGE-Antigene, als Untergruppe der CT-Antigene, gelten als geeignete Ziele für die Immuntherapie, wegen der weitgehenden Beschränkung ihrer Expression auf Tumorgewebe und Keimzellgewebe, ihrer Fähigkeit im Zusammenhang mit MHC Molekülen eine natürliche humorale sowie zelluläre Immunantwort auszulösen und der großen Häufigkeit mit der sie in Tumorgeweben exprimiert werden [36, 37, 41, 42, 67, 70].

Die ersten klinischen Studien zur Vakzinierung von synthetischen MAGE-Peptiden, entweder in löslicher Form oder zusammen mit patientenspezifischen ex-vivo gezüchteten dendritischen Zellen, wurden bei Patienten mit metastasierenden Melanomen durchgeführt und verfolgten die Induktion antigenspezifischer CTL [94, 95].

Die Erkennung spezifischer T-Lymphozyten nach der Immunsierung ist schwierig, auch wenn ein therapeutischer Effekt eintritt [62, 94-96].

Vakzinierungen mit einem Peptid des MAGE-3A1 bewirkten bei Patienten mit Melanometastasen in 7/25 Fällen eine Tumorregression. Bei 3 Patienten war die Tumorregression sogar vollständig und 2 von diesen 3 Patienten waren nach 2 Jahren noch tumorfrei. In dieser Studie konnte jedoch keine messbare CTL-Reaktion im Patientenblut nachgewiesen werden [94].

Patienten mit denselben Tumorentitäten wurden im Rahmen einer anderen Studie mit MAGE-3A1 zusammen mit dendritischen Zellen geimpft. Hier konnte eine Tumorregression in 6/11 Fällen erreicht werden und eine Expansion von tumorspezifischen CTL im Blut nachgewiesen werden [95]. Ähnliche therapeutische Effekte konnten auch in anderen Studien demonstriert werden [62, 94-96].

Eine monoclonale CTL-Antwort konnte auch bei einem Patienten nachgewiesen werden, der mit MAGE-A3 Peptiden geimpft wurde [97].

Vantomme V. et al. zeigten 2004, dass die Impfung von Krebspatienten mit MAGE-A3 und dem Adjuvant ASO2B eine MAGE-A3-Antikörperproduktion und eine T-Zellantwort auslöst [98].

Atanackovic D. et al. demonstrierten 2004, dass Tumorpatienten, die mit MAGE-A3 Proteinen und dem Adjuvant A 30 geimpft wurden, mehr als 3 Jahre klinisch tumorfrei blieben [99].

Ein anderer Ansatz der Immuntherapie ist die Impfung von geklonten CTL Zellen [100].

Die Expression von MAGE-A-Antigenen ist heterogen und unterschiedlich für verschiedene Gebiete in ein und demselben Tumor. Dies bedeutet, dass vor einer Immuntherapie herausgefunden werden muss welche MAGE Untergruppen am häufigsten exprimiert werden, damit die Therapie auf diese abzielen kann [41].

Ein Weg die Heterogenität zu überwinden wäre, die CT-Antigenexpression im Tumorgewebe zu erhöhen oder zu induzieren, z.B. durch Verabreichung von Histondeacetylase Hemmern und/oder DNA demethylierenden Agenzien, um die Tumorzellen angreifbar zu machen [101, 102].

In der Literatur wird jedoch von einem Fall berichtet, bei dem durch die Impfung mit einer geklonten Population von CD4+ T-Zellen, die sich speziell nur gegen ein einziges CT-Antigen, nämlich NY-ESO-1, richtet, eine vollständige Remission / Regression des Tumors erreicht wurde, obwohl nicht alle Tumorzellen dieses Antigen exprimierten. Vermutlich sind bei der Lyse von NY-ESO-1 exprimierenden Tumorzellen andere Antigene aus Apoptosekörpern freigeworden und konnten ihrerseits eine T-Zell Antwort auslösen. Es wäre ebenfalls denkbar, dass Bestandteile anderer CT-Antigene, die mit Bestandteilen von NY-ESO-1 übereinstimmen, von den geimpften CD4+ T-Zellen erkannt wurden [100].

Dieses Beispiel verdeutlicht das Potential, das in der Immuntherapie von Tumoren steckt und fordert weitere intensive Forschungen auf diesem Gebiet.

Wie der vorliegenden Arbeit zu entnehmen ist, steigt die Expression der MAGE-Antigene mit zunehmender Aggressivität (N+), mit zunehmender Tumorausdehnung und mit zunehmender Entdifferenzierung des Tumors. Gerade das Patientenkollektiv mit solchen prognostisch schlechten Tumoreigenschaften, könnte enorm von der Immuntherapie, z.B. als adjuvante Therapieform, profitieren.

4.2.2. CT-Expression als diagnostisch relevanter Faktor

Auch in der Diagnostik und in der Krebsprävention könnten CT-Antigene eine wichtige Rolle spielen.

Die Inzidenz von Fernmetastasen, ausgehend von oralen PEC, wird in der Literatur mit 13% angegeben und das Risiko einen sekundären Primärtumor zu entwickeln mit bis zu 30% [5].

Eine okkulte Disseminierung singulärer Tumorzellen in regionale Lymphknoten oder in Sekundärorgane könnte auch nach einer radikalen Operation Ausgangspunkt von klinisch manifesten Metastasen sein [103].

Bei der konventionellen histopathologischen Untersuchung sind diese minimalen Tumorabsiedlungen oft nicht nachweisbar. Bei Patienten, die nach einer Erkrankung mit einem Ösophaguskarzinom, nach pathologischen Routineuntersuchungen als tumorfrei eingestuft wurden, konnten mit immunhistochemischen Verfahren einzelne Tumorzellen in Lymphknoten nachgewiesen werden. Dadurch fiel ihre Prognose signifikant schlechter aus [104]. Für ein akkurates Staging müssten folglich, zusätzlich zu den bewährten Methoden, immunhistochemische Verfahren zum Zug kommen [105].

Solche seltenen verstreuten Tumorzellen wurden in peritonealer Flüssigkeit, in Knochen, Speichel, Knochenmark, Lymphknoten und Blut von Patienten, die an vielen verschiedenen Tumoren erkrankt waren, identifiziert. In diesen Proben wurde, im Gegensatz zu Proben von gesunden Kontrollpersonen, ein heterogenes Expressionsmuster von MAGE entdeckt [106-114].

Proben von Körperflüssigkeiten, wie z.B. Speichel, könnten beim PEC des Kopf- und Halsbereichs dazu verwendet werden, Rezidive oder Sekundärtumoren zu entdecken, bevor deren Symptome klinisch manifest werden [62, 109].

Patienten mit einer solchen minimalen Tumorlast könnten frühzeitig durch geeignete Impfstoffe auf Basis der CT-Antigen induzierten Immunantwort therapiert werden [62].

Auch in den Resektionsrändern versteckte Mikrometastasen könnten intraoperativ mittels CT-Antigen-Erkennung diagnostiziert werden. Das Auftreten von Lokalrezidiven könnte so reduziert werden [115].

Die Expression von MAGE-A-Antigenen im normalen Gewebe, das an Tumoren der Speiseröhre und der Lunge angrenzte, wurde in diesem Zusammenhang berichtet [107, 116].

Tumorzellen, die die Fähigkeit besitzen, vom Immunsystem nicht erkannt zu werden, und dadurch einen Überlebensvorteil haben, könnten der Grund für die Tumorzell dissemination sein. Einen solchen Überlebensvorteil stellt z.B. eine defekte HLA-1 Antigenexpression dar. Tumorzellen mit diesem Defekt werden nicht mehr als „körperfremd“ erkannt und entziehen sich auf diese Weise dem Angriff durch CTL [117]. Diese Tumorzellen müssten vor einer Immuntherapie, wie oben beschrieben, erst wieder der körpereigenen Immunreaktion zugänglich gemacht werden [101, 102].

1953 führten Slaughter et al. erstmals den Begriff der „Feld-Kanzerisierung“ im Zusammenhang mit ihren Beobachtungen an histologisch abnormen Gewebe in der Umgebung von oralen PEC ein [118].

Jüngste Forschungen auf molekularer Ebene unterstützen dieses Modell, das die Entwicklung eines Feldes mit genetisch alterierten Zellen in den Mittelpunkt der Kanzerogenese stellt, und neben dem PEC des Kopf- und Halsbereichs auch für weitere Organsysteme wie Lunge, Speiseröhre, Vulva, Zervix, Kolon, Brust, Blase und Haut gilt [118-127].

Im oralen PEC verändert sich eine Stammzelle genetisch und formt mit ihren Tochterzellen einen „Fleck“ PT53-mutierter Zellen. Die Vorgänge, die bei der Umwandlung von einem „Fleck“ zu einem „Feld“ stattfinden, sind noch nicht geklärt. Ein Feld ist eine epitheliale Läsion, die aus Zellen mit krebsähnlichen Genabberationen (3p, 9p, 8p, 18p), besteht. In der Mukosa des Kopf- und Hals-Bereichs wurden solche Felder mit einem Durchmesser von

mehr als 7cm entdeckt. Bei dem Übergang von einem präneoplastischen Feld zu einem oder mehreren Tumoren scheint die 11p13 Amplifizierung von Bedeutung zu sein [128].

Nach der radikalen Resektion von primären Tumoren, bleiben Anteile solcher präneoplastischer Felder bestehen, woraus sich später sogenannte „Lokalrezidive“ oder „sekundäre Primärtumoren“ entwickeln können [129, 130].

Aus diesem Grund sollte sich die Diagnose und Therapie des PEC nicht nur auf den Tumor, sondern ebenfalls auf das ihn umgebende genetisch alterierte Feld beziehen. Das Auffinden und Beobachten solcher Felder wäre ein Meilenstein in der Krebsprevention [128].

Dabei und bei der Therapierung von präkanzerogenen Feldern, die chirurgisch wegen ihrer Ausdehnung oft nicht beherrschbar sind, könnten die MAGE-Antigene ihren Beitrag leisten.

4.2.3. CT-Expression als Prognosefaktor

Manche klinisch kleinen Tumoren können von starker biologischer Aggressivität sein und früh in die regionalen Lymphknoten metastasieren. Einige große Tumore metastasieren hingegen nur sehr langsam und ziehen eine sehr lange posttherapeutische tumorfreie Zeit nach sich [21].

Tumoren gleicher TNM Klassifikation können sich folglich klinisch unterschiedlich verhalten und von unterschiedlicher biologischer Aggressivität sein [5]

Die CT-Expression im einzelnen Tumor könnte als zusätzlicher Parameter dabei helfen, die individuelle Prognose eines Krebspatienten einzuschätzen.

In einigen Studien wurde die Expression von MAGE-Antigenen mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Tumorpatienten korreliert.

Bandi et al. stellten 2006 bei Patienten mit MAGE-A4 positiven invasiven duktalem Brustkrebstumoren retrospektiv ein signifikant längeres Überleben fest, als bei MAGE-A4-negativen Tumorpatientinnen [131].

Dieses Ergebnis könnte mit der antitumorösen und proapoptotischen Aktivität von MAGE-A4 in Zusammenhang gebracht werden: Durch die Bindung von MAGE-A4 an Gankyrin wird dessen kanzerogene Aktivität unterdrückt, da Gankyrin die tumorsupprimierende Wirkung von Rb hindert und den Tumorsuppressorgenen p16, p18 und p53 entgegenwirkt [52-54]. Darüber hinaus kann das c-terminale 107 AS lange Fragment des MAGE-A4-Antigens unter genotoxischem Stress abgespalten werden und eine p53 abhängige sowie p53 unabhängige Apoptose bewirken und zusätzlich den p53-Proteinspiegel anheben [55].

Andere Studien beweisen jedoch das Gegenteil:

Jehle findet 2007 beim oralen PEC keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der MAGE-A4 Expression und der Überlebenswahrscheinlichkeit, aber zeigt im Gegensatz dazu, dass die positive Färbung der MAGE-Antigene mit dem monoklonalen Antikörper 57B mit einer signifikant verkürzten tumorbezogenen Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert [71]. Die Anfärbung mit 57B scheint sich daher als bedeutungsvoller Marker für einen ungünstigen Krankheitsverlauf zu eignen [71].

Patienten mit Blasenkarzinomen, bei denen sich das Tumorgewebe mit 57B anfärben lässt, weisen, auch nach Kocher et al. (2002), ein verringertes tumorspezifisches Überleben auf [132].

5. Zusammenfassung:

Da sich die Expression der MAGE-A-Antigene weitgehend auf Tumorgewebe und Keimzellen beschränkt und MAGE-A-Antigene in der Lage sind eine natürliche zelluläre und humorale Immunantwort auszulösen, sind sie nicht nur als Prognose- und Diagnosefaktoren interessant, sondern auch als Ausgangspunkt für immuntherapeutische Ansätze.

In der vorliegenden Studie wurde die Expression der MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, und -A12-Antigene im Tumorgewebe von 48 primären PEC des Mund-Kiefer- und Gesichtsbereichs nachgewiesen, indem histopathologische Schnitte mit dem monoklonalen globalen MAGE-A Antikörper 57B angefärbt wurden. Die Anzahl der pro Tumorprobe angefärbten Zellen wurde in einen Score von 0-5 überführt. Die Scorewerte wurden mit folgenden klinischen Parametern des Patientenkollektivs, die retrospektiv nach Aktenlage erhoben und im zentralen Tumorregister der DÖSAK verwaltet wurden, in Zusammenhang gebracht: Tumorgroße, Infiltrationsverhalten in Nachbarstrukturen, Entdifferenzierungsgrad, Lymphknotenbefall, Geschlecht, Alter, vorhandenen Risikofaktoren, frühere und simultane Tumorgeschehen, Histologie und Tumorlokalisation.

Die statistische Analyse mittels nicht-parametrischen Tests wurde bei den Variablen Geschlecht, Tumorgroße, Entdifferenzierungsgrad und Lymphknotenbefall angewendet und kam bei keiner der untersuchten Variablen zu einem signifikanten Ergebnis.

Die Autorin möchte jedoch nicht generell mögliche signifikante Ergebnisse ausschließen. Es können Tendenzen in der Korrelation der Expression von MAGE-A-Antigenen festgestellt werden, die auch in anderen Untersuchungen des oralen PEC und anderer epithelialer Tumoren auftreten. Eindeutigere Ergebnisse könnten Studien größerer Fallzahlen der einzelnen Untersuchungsgruppen (die pT-Klassifikation teilt sich z.B. in 5 Untergruppen ein) liefern.

In der vorliegenden Studie exprimierten 54% der untersuchten PEC MAGE-A-Antigene. Tendenziell konnte festgestellt werden, dass die Expression von MAGE-A-Antigenen bei Frauen, älteren Patienten, höherem Entdifferenzierungsgrad des Tumorgewebes, größeren und in Nachbarstrukturen infiltrierenden Tumoren und bei vorhandenem Lymphknotenbefall erhöht ist. Für die Parameter Tumorlokalisation, Risikofaktoren, Tumorhistologie und anderen früheren oder simultanen Tumorgeschehen konnte keine deutliche Tendenz festgestellt werden.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht [85].

6. Literaturverzeichnis

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: **Global cancer statistics, 2002.** *CA Cancer J Clin* 2005, **55**(2):74-108.
2. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P: **Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006.** *Ann Oncol* 2007, **18**(3):581-592.
3. Karim-Kos HE, de Vries E, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JW: **Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s.** *Eur J Cancer* 2008, **44**(10):1345-1389.
4. Batzler WU GK HS, Husmann G, Kaatsch P, Katalanic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R, Stegmaier C, Bertz J, Hberland J, Wolf U: **Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends.** In. Berlin: Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg); 2008.
5. Bettendorf O, Piffko J, Bankfalvi A: **Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy?** *Oral Oncol* 2004, **40**(2):110-119.
6. Kaanders JH IP, Pop LA, Lenarz T, de Mulder PH, Schmoll HJ, Marres HA: **Hypopharynxkarzinom**, vol. 2. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag GmbH; 1997.
7. Bray I, Brennan P, Boffetta P: **Projections of alcohol- and tobacco-related cancer mortality in Central Europe.** *Int J Cancer* 2000, **87**(1):122-128.
8. Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Goran Hansson B, Andersson G: **Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden.** *Acta Otolaryngol* 2005, **125**(12):1327-1336.
9. Rosenquist K, Wennerberg J, Annertz K, Schildt EB, Hansson BG, Bladstrom A, Andersson G: **Recurrence in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: human papillomavirus and other risk factors.** *Acta Otolaryngol* 2007, **127**(9):980-987.
10. Rosenquist K: **Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden.** *Swed Dent J Suppl* 2005, **179**(179):1-66.

11. Wynder EL: **Environmental causes of cancer in man.** *Med Clin North Am* 1956, **40**(3):629-645.
12. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L *et al*: **Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.** *J Natl Cancer Inst* 2007, **99**(10):777-789.
13. Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Janout V, Fabianova E, Bencko V, Moullan N *et al*: **Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, **15**(4):696-703.
14. Brennan P, Boffetta P: **Mechanistic considerations in the molecular epidemiology of head and neck cancer.** *IARC Sci Publ* 2004, **157**(157):393-414.
15. PA R: **Orale Leukoplakie/Erythroplakie. Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-Mund und Kieferheilkunde (DGZMK).** *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 62 2007, **01**:45-48
16. Shaha AR, Spiro RH, Shah JP, Strong EW: **Squamous carcinoma of the floor of the mouth.** *Am J Surg* 1984, **148**(4):455-459.
17. Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V: **Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer.** *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001, **63**(4):202-207.
18. Merino OR, Lindberg RD, Fletcher GH: **An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts.** *Cancer* 1977, **40**(1):145-151.
19. Kotwall C, Sako K, Razack MS, Rao U, Bakamjian V, Shedd DP: **Metastatic patterns in squamous cell cancer of the head and neck.** *Am J Surg* 1987, **154**(4):439-442.
20. Choi KK, Kim MJ, Yun PY, Lee JH, Moon HS, Lee TR, Myoung H: **Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults.** *Oral Oncol* 2006, **42**(2):208-217.
21. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, Homer L: **Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade.** *J Oral Maxillofac Surg* 2005, **63**(11):1599-1605.

22. Greene FL, PD FI, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M: **AJCC cancer staging manual**. New York: ed. Springer-Verlag; 2002.
23. O'Sullivan B, Shah J: **New TNM staging criteria for head and neck tumors**. *Semin Surg Oncol* 2003, **21**(1):30-42.
24. Wenzel S, Sagowski C, Kehrl W, Metternich FU: **[Retrospective analysis of the prognostic significance of depth of invasion of advanced oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas with lymph node metastases]**. *Hno* 2004, **52**(7):604-610.
25. He P, Xiao K, Li X, Zhou L, Lu H: **[Clinical significance of lymph vessel density marked by lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor-1 in laryngeal squamous cell carcinomas]**. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2006, **20**(18):828-830, 833.
26. Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, Cox G, Harris AL, Jackson DG: **Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer**. *Cancer Res* 2002, **62**(5):1315-1320.
27. Zendman AJ, Ruiter DJ, Van Muijen GN: **Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function**. *J Cell Physiol* 2003, **194**(3):272-288.
28. Scully C, Bagan JV: **Recent advances in Oral Oncology**. *Oral Oncol* 2007, **43**(2):107-115.
29. Yao M, Epstein JB, Modi BJ, Pytynia KB, Mundt AJ, Feldman LE: **Current surgical treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck**. *Oral Oncol* 2007, **43**(3):213-223.
30. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, Komaroff E, Nalysnyk L, Zilberberg MD: **Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review**. *Radiother Oncol* 2003, **66**(3):253-262.
31. Folz BJ, Silver CE, Rinaldo A, Fagan JJ, Pratt LW, Weir N, Seitz D, Ferlito A: **An outline of the history of head and neck oncology**. *Oral Oncol* 2008, **44**(1):2-9.
32. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T: **A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma**. *Science* 1991, **254**(5038):1643-1647.
33. Xiao J, Chen HS: **Biological functions of melanoma-associated antigens**. *World J Gastroenterol* 2004, **10**(13):1849-1853.

34. Costa FF, Le Blanc K, Brodin B: **Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer.** *Stem Cells* 2007, **25**(3):707-711.
35. Muller-Richter UD, Dowejko A, Zhou W, Reichert TE, Driemel O: **Different expression of MAGE-A-antigens in foetal and adult keratinocyte cell lines.** *Oral Oncol* 2008, **44**(7):628-633.
36. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ: **The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary.** *Cancer Immun* 2004, **4**(1):1.
37. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT: **Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy.** *Immunol Rev* 2002, **188**:22-32.
38. Gillespie AM, Coleman RE: **The potential of melanoma antigen expression in cancer therapy.** *Cancer Treat Rev* 1999, **25**(4):219-227.
39. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T: **The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(14):7149-7153.
40. De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T: **DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(11):7327-7335.
41. Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J: **Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy.** *Int J Oncol* 2005, **26**(3):817-824.
42. Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, Lee KD, Nakano K, Masuyama K, Itoh K, Ishikawa T: **Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas.** *Int J Cancer* 1995, **64**(5):304-308.
43. Lee KD, Eura M, Ogi K, Nakano K, Chikamatsu K, Masuyama K, Ishikawa T: **Expression of the MAGE-1, -2, -3, -4, and -6 genes in non-squamous cell carcinoma lesions of the head and neck.** *Acta Otolaryngol* 1996, **116**(4):633-639.
44. Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA: **Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(18):5442-5447.
45. Traversari C, van der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, De Plaen E, Amar-Costesec A, Boon T: **A nonapeptide encoded by human gene**

- MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E.** *J Exp Med* 1992, **176**(5):1453-1457.
46. Laduron S, Deplus R, Zhou S, Kholmanskikh O, Godelaine D, De Smet C, Hayward SD, Fuks F, Boon T, De Plaen E: **MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(14):4340-4350.
 47. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P *et al*: **Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation.** *Embo J* 2001, **20**(13):3427-3436.
 48. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui CC, Clevers H, Dotto GP, Radtke F: **Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin.** *Nat Genet* 2003, **33**(3):416-421.
 49. Bolos V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL: **Notch signaling in development and cancer.** *Endocr Rev* 2007, **28**(3):339-363.
 50. Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, Rodolfo M, Schneider C: **MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(30):11160-11165.
 51. Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KM, Gravekamp C, Setaluri V, Peters N, Hoffmann FM *et al*: **MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines.** *Cancer Res* 2007, **67**(20):9954-9962.
 52. Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Sakurai T, Dawson S, Mayer RJ, Itoh K, Fujita J: **MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity.** *J Biol Chem* 2003, **278**(12):10668-10674.
 53. Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, Dawson S, Nonoguchi K, Kido T, Mayer RJ, Arai S, Fujita J: **Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas.** *Nat Med* 2000, **6**(1):96-99.
 54. Dawson S, Higashitsuji H, Wilkinson AJ, Fujita J, Mayer RJ: **Gankyrin: a new oncoprotein and regulator of pRb and p53.** *Trends Cell Biol* 2006, **16**(5):229-233.
 55. Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J: **A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells.** *J Biol Chem* 2004, **279**(15):15505-15514.

56. Park JH, Kong GH, Lee SW: **hMAGE-A1 overexpression reduces TNF-alpha cytotoxicity in ME-180 cells.** *Mol Cells* 2002, **14**(1):122-129.
57. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ: **Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(8):615-625.
58. Old LJ: **Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer.** *Cancer Immun* 2001, **1**(1):1.
59. Acevedo HF, Tong JY, Hartsock RJ: **Human chorionic gonadotropin-beta subunit gene expression in cultured human fetal and cancer cells of different types and origins.** *Cancer* 1995, **76**(8):1467-1475.
60. Gjerstorff MF, Kock K, Nielsen O, Ditzel HJ: **MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development.** *Hum Reprod* 2007, **22**(4):953-960.
61. Osterlund C, Tohonen V, Forslund KO, Nordqvist K: **Mage-b4, a novel melanoma antigen (MAGE) gene specifically expressed during germ cell differentiation.** *Cancer Res* 2000, **60**(4):1054-1061.
62. Juretic A, Spagnoli GC, Schultz-Thater E, Sarcevic B: **Cancer/testis tumour-associated antigens: immunohistochemical detection with monoclonal antibodies.** *Lancet Oncol* 2003, **4**(2):104-109.
63. Fischer C, Gudat F, Stulz P, Noppen C, Schaefer C, Zajac P, Trutmann M, Kocher T, Zuber M, Harder F *et al*: **High expression of MAGE-3 protein in squamous-cell lung carcinoma.** *Int J Cancer* 1997, **71**(6):1119-1121.
64. Hofbauer GF, Schaefer C, Noppen C, Boni R, Kamarashev J, Nestle FO, Spagnoli GC, Dummer R: **MAGE-3 immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution.** *Am J Pathol* 1997, **151**(6):1549-1553.
65. Rimoldi D, Salvi S, Schultz-Thater E, Spagnoli GC, Cerottini JC: **Anti-MAGE-3 antibody 57B and anti-MAGE-1 antibody 6C1 can be used to study different proteins of the MAGE-A family.** *Int J Cancer* 2000, **86**(5):749-751.
66. Landry C, Brasseur F, Spagnoli GC, Marbaix E, Boon T, Coulie P, Godelaine D: **Monoclonal antibody 57B stains tumor tissues that express gene MAGE-A4.** *Int J Cancer* 2000, **86**(6):835-841.
67. Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, Spagnoli GC, Old LJ: **Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer.** *Int J Cancer* 2000, **85**(4):460-465.

68. Ries J, Vairaktaris E, Mollaoglu N, Wiltfang J, Neukam FW, Nkenke E: **Expression of melanoma-associated antigens in oral squamous cell carcinoma.** *J Oral Pathol Med* 2008, **37**(2):88-93.
69. Figueiredo DL, Mamede RC, Proto-Siqueira R, Neder L, Silva WA, Jr., Zago MA: **Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas.** *Head Neck* 2006, **28**(7):614-619.
70. Kienstra MA, Neel HB, Strome SE, Roche P: **Identification of NY-ESO-1, MAGE-1, and MAGE-3 in head and neck squamous cell carcinoma.** *Head Neck* 2003, **25**(6):457-463.
71. Jehle MA: **MAGE-A-, p53-, und p21- Expression als prognostischer Marker bei oralen Plattenepithelkarzinomen.** In.: Medizinische Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; 2007: 39.
72. Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungbluth A, Ritter G, Chen YT, Stockert E, Tsushima T *et al*: **Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade.** *Cancer Res* 2001, **61**(12):4671-4674.
73. Atanackovic D, Blum I, Cao Y, Wenzel S, Bartels K, Faltz C, Hossfeld DK, Hegewisch-Becker S, Bokemeyer C, Leuwer R: **Expression of cancer-testis antigens as possible targets for antigen-specific immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma.** *Cancer Biol Ther* 2006, **5**(9):1218-1225.
74. Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF: **Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters.** *Cancer Lett* 2005, **219**(2):223-232.
75. Suzuki K, Tsujitani S, Konishi I, Yamaguchi Y, Hirooka Y, Kaibara N: **Expression of MAGE genes and survival in patients with hepatocellular carcinoma.** *Int J Oncol* 1999, **15**(6):1227-1232.
76. Liu L, Wylie RC, Andrews LG, Tollefsbol TO: **Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection.** *Mech Ageing Dev* 2003, **124**(10-12):989-998.
77. Haier J, Owzcareck M, Guller U, Spagnoli GC, Burger H, Senninger N, Kocher T: **Expression of MAGE-A cancer/testis antigens in esophageal squamous cell carcinomas.** *Anticancer Res* 2006, **26**(3B):2281-2287.
78. Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rughetti A, Panici PB, Nuti M: **Cancer testis antigen expression in primary and recurrent**

- vulvar cancer: association with prognostic factors.** *Eur J Cancer* 2007, **43**(17):2621-2627.
79. Bolli M, Kocher T, Adamina M, Guller U, Dalquen P, Haas P, Mirlacher M, Gambazzi F, Harder F, Heberer M *et al*: **Tissue microarray evaluation of Melanoma antigen E (MAGE) tumor-associated antigen expression: potential indications for specific immunotherapy and prognostic relevance in squamous cell lung carcinoma.** *Ann Surg* 2002, **236**(6):785-793; discussion 793.
 80. Theurillat JP, Ingold F, Frei C, Zippelius A, Varga Z, Seifert B, Chen YT, Jager D, Knuth A, Moch H: **NY-ESO-1 protein expression in primary breast carcinoma and metastases: correlation with CD8+ T-cell and CD79a+ plasmacytic/B-cell infiltration.** *Int J Cancer* 2007, **120**(11):2411-2417.
 81. Napoletano C, Bellati F, Tarquini E, Tomao F, Taurino F, Spagnoli G, Rughetti A, Muzii L, Nuti M, Benedetti Panici P: **MAGE-A and NY-ESO-1 expression in cervical cancer: prognostic factors and effects of chemotherapy.** *Am J Obstet Gynecol* 2008, **198**(1):99 e91-97.
 82. Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A: **Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma.** *Oncology* 2003, **64**(4):443-449.
 83. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T: **Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(9):744-749.
 84. Jung A, Brabletz T, Kirchner T: **The migrating cancer stem cells model--a conceptual explanation of malignant tumour progression.** *Ernst Schering Found Symp Proc* 2006, **5**(5):109-124.
 85. Muller-Richter UD, Dowejko A, Peters S, Rauthe S, Reuther T, Gattenlohner S, Reichert TE, Driemel O, Kubler AC: **MAGE-A antigens in patients with primary oral squamous cell carcinoma.** *Clin Oral Investig* 2009, **2**:2.
 86. Konishi J, Toyooka S, Aoe M, Omura Y, Washio K, Tsukuda K, Shimizu N: **The relationship between NY-ESO-1 mRNA expression and clinicopathological features in non-small cell lung cancer.** *Oncol Rep* 2004, **11**(5):1063-1067.
 87. Patard JJ, Brasseur F, Gil-Diez S, Radvanyi F, Marchand M, Francois P, Abi-Aad A, Van Cangh P, Abbou CC, Chopin D *et al*: **Expression of MAGE genes in**

- transitional-cell carcinomas of the urinary bladder.** *Int J Cancer* 1995, **64**(1):60-64.
88. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M: **The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors.** *Nucleic Acids Res* 1983, **11**(19):6883-6894.
 89. Grah J, Samija M, Juretic A, Sarcevic B, Sobat H: **Immunohistochemical expression of cancer/testis antigens (MAGE-A3/4, NY-ESO-1) in non-small cell lung cancer: the relationship with clinical-pathological features.** *Coll Antropol* 2008, **32**(3):731-736.
 90. Hansel DE, House MG, Ashfaq R, Rahman A, Yeo CJ, Maitra A: **MAGE1 is expressed by a subset of pancreatic endocrine neoplasms and associated lymph node and liver metastases.** *Int J Gastrointest Cancer* 2003, **33**(2-3):141-147.
 91. Knuth A, Danowski B, Oettgen HF, Old LJ: **T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**(11):3511-3515.
 92. Mukherji B, MacAlister TJ: **Clonal analysis of cytotoxic T cell response against human melanoma.** *J Exp Med* 1983, **158**(1):240-245.
 93. Zinkernagel RM, Doherty PC: **MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness.** *Adv Immunol* 1979, **27**:51-177.
 94. Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y *et al*: **Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1.** *Int J Cancer* 1999, **80**(2):219-230.
 95. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P *et al*: **Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.** *J Exp Med* 1999, **190**(11):1669-1678.
 96. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D: **Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells.** *Nat Med* 1998, **4**(3):328-332.
 97. Coulie PG, Karanikas V, Colau D, Lurquin C, Landry C, Marchand M, Dorval T, Brichard V, Boon T: **A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a**

- melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(18):10290-10295.
98. Vantomme V, Dantinne C, Amrani N, Permanne P, Gheysen D, Bruck C, Stoter G, Britten CM, Keilholz U, Lamers CH *et al*: **Immunologic analysis of a phase I/II study of vaccination with MAGE-3 protein combined with the AS02B adjuvant in patients with MAGE-3-positive tumors.** *J Immunother* 2004, **27**(2):124-135.
 99. Atanackovic D, Altorki NK, Stockert E, Williamson B, Jungbluth AA, Ritter E, Santiago D, Ferrara CA, Matsuo M, Selvakumar A *et al*: **Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients.** In: *J Immunol: Mar 1 2004*; 2004: 3289-3296.
 100. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, Jungbluth A, Gnjjatic S, Thompson JA, Yee C: **Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1.** *N Engl J Med* 2008, **358**(25):2698-2703.
 101. Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F: **Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment.** *Int J Cancer* 2001, **94**(2):243-251.
 102. Weiser TS, Guo ZS, Ohnmacht GA, Parkhurst ML, Tong-On P, Marincola FM, Fischette MR, Yu X, Chen GA, Hong JA *et al*: **Sequential 5-Aza-2'-deoxycytidine-Depsipeptide FR901228 Treatment Induces Apoptosis Preferentially in Cancer Cells and Facilitates Their Recognition by Cytolytic T Lymphocytes Specific for NY-ESO-1.** *J Immunother (1991)* 2001, **24**(2):151-161.
 103. Hosch S, Kraus J, Scheunemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schumacher U, Witter K, Speicher MR, Pantel K: **Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer.** *Cancer Res* 2000, **60**(24):6836-6840.
 104. Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, Rehders A, Busch C, Niendorf A, Passlick B, Broelsch CE, Pantel K: **Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer.** *N Engl J Med* 1997, **337**(17):1188-1194.
 105. Hosch SB, Stoecklein NH, Pichlmeier U, Rehders A, Scheunemann P, Niendorf A, Knoefel WT, Izbicki JR: **Esophageal cancer: the mode of lymphatic tumor cell spread and its prognostic significance.** *J Clin Oncol* 2001, **19**(7):1970-1975.

106. Kufer P, Zippelius A, Lutterbuse R, Mecklenburg I, Enzmann T, Montag A, Weckermann D, Passlick B, Prang N, Reichardt P *et al*: **Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease.** *Cancer Res* 2002, **62**(1):251-261.
107. Jang SJ, Soria JC, Wang L, Hassan KA, Morice RC, Walsh GL, Hong WK, Mao L: **Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis.** *Cancer Res* 2001, **61**(21):7959-7963.
108. Kobayashi Y, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Ishizaki M, Kaneyoshi T, Toshikuni N, Kariyama K, Nakayama E, Tsuji T: **Expression of MAGE, GAGE and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma.** *J Hepatol* 2000, **32**(4):612-617.
109. Hofmann M, Ruschenburg I: **mRNA detection of tumor-rejection genes BAGE, GAGE, and MAGE in peritoneal fluid from patients with ovarian carcinoma as a potential diagnostic tool.** *Cancer* 2002, **96**(3):187-193.
110. Hoon DS, Kuo CT, Wascher RA, Fournier P, Wang HJ, O'Day SJ: **Molecular detection of metastatic melanoma cells in cerebrospinal fluid in melanoma patients.** *J Invest Dermatol* 2001, **117**(2):375-378.
111. Hoon DS, Wang Y, Dale PS, Conrad AJ, Schmid P, Garrison D, Kuo C, Foshag LJ, Nizze AJ, Morton DL: **Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay.** *J Clin Oncol* 1995, **13**(8):2109-2116.
112. Taback B, Chan AD, Kuo CT, Bostick PJ, Wang HJ, Giuliano AE, Hoon DS: **Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multimolecular marker assay: correlation with clinical stage of disease.** *Cancer Res* 2001, **61**(24):8845-8850.
113. Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, Sugita Y, Yasuda T, Doki Y, Tamura S, Yano M, Shiozaki H, Matsuura N *et al*: **Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with gastric carcinoma by multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay.** *Cancer* 2001, **92**(8):2056-2064.
114. Kwon S, Kang SH, Ro J, Jeon CH, Park JW, Lee ES: **The melanoma antigen gene as a surveillance marker for the detection of circulating tumor cells in patients with breast carcinoma.** *Cancer* 2005, **104**(2):251-256.
115. Yoshioka S, Fujiwara Y, Sugita Y, Okada Y, Yano M, Tamura S, Yasuda T, Takiguchi S, Shiozaki H, Monden M: **Real-time rapid reverse transcriptase-**

- polymerase chain reaction for intraoperative diagnosis of lymph node micrometastasis: clinical application for cervical lymph node dissection in esophageal cancers.** *Surgery* 2002, **132**(1):34-40.
116. Zambon A, Mandruzzato S, Parenti A, Macino B, Dalerba P, Ruol A, Merigliano S, Zaninotto G, Zanovello P: **MAGE, BAGE, and GAGE gene expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the gastric cardia.** *Cancer* 2001, **91**(10):1882-1888.
 117. Hammerling GJ, Klar D, Pulm W, Momburg F, Moldenhauer G: **The influence of major histocompatibility complex class I antigens on tumor growth and metastasis.** *Biochim Biophys Acta* 1987, **907**(3):245-259.
 118. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: **Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin.** *Cancer* 1953, **6**(5):963-968.
 119. Copper MP, Braakhuis BJ, de Vries N, van Dongen GA, Nauta JJ, Snow GB: **A panel of biomarkers of carcinogenesis of the upper aerodigestive tract as potential intermediate endpoints in chemoprevention trials.** *Cancer* 1993, **71**(3):825-830.
 120. Franklin WA, Gazdar AF, Haney J, Wistuba, II, La Rosa FG, Kennedy T, Ritchey DM, Miller YE: **Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis.** *J Clin Invest* 1997, **100**(8):2133-2137.
 121. Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ: **p53-mutant clones and field effects in Barrett's esophagus.** *Cancer Res* 1999, **59**(19):4784-4787.
 122. Rosenthal AN, Ryan A, Hopster D, Jacobs IJ: **Molecular evidence of a common clonal origin and subsequent divergent clonal evolution in vulval intraepithelial neoplasia, vulval squamous cell carcinoma and lymph node metastases.** *Int J Cancer* 2002, **99**(4):549-554.
 123. Chu TY, Shen CY, Lee HS, Liu HS: **Monoclonality and surface lesion-specific microsatellite alterations in premalignant and malignant neoplasia of uterine cervix: a local field effect of genomic instability and clonal evolution.** *Genes Chromosomes Cancer* 1999, **24**(2):127-134.
 124. Jothy S, Slesak B, Harlozinska A, Lapinska J, Adamiak J, Rabczynski J: **Field effect of human colon carcinoma on normal mucosa: relevance of carcinoembryonic antigen expression.** *Tumour Biol* 1996, **17**(1):58-64.

125. Forsti A, Louhelainen J, Soderberg M, Wijkstrom H, Hemminki K: **Loss of heterozygosity in tumour-adjacent normal tissue of breast and bladder cancer.** *Eur J Cancer* 2001, **37**(11):1372-1380.
126. Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y, Mitsumori K, Akao T, Terachi T, Yoshida O: **Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract.** *Cancer Res* 1998, **58**(24):5835-5841.
127. Stern RS, Bolshakov S, Nataraj AJ, Ananthaswamy HN: **p53 mutation in nonmelanoma skin cancers occurring in psoralen ultraviolet a-treated patients: evidence for heterogeneity and field cancerization.** *J Invest Dermatol* 2002, **119**(2):522-526.
128. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH: **A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications.** *Cancer Res* 2003, **63**(8):1727-1730.
129. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJ: **Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**(6):1523-1532.
130. Partridge M, Li SR, Pateromichelakis S, Francis R, Phillips E, Huang XH, Tesfayeh F, Langdon JD: **Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**(7):2718-2725.
131. Bandic D, Juretic A, Sarcevic B, Separovic V, Kujundzic-Tiljak M, Hudolin T, Spagnoli GC, Covic D, Samija M: **Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1, and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: retrospective immunohistochemical study.** *Croat Med J* 2006, **47**(1):32-41.
132. Kocher T, Zheng M, Bolli M, Simon R, Forster T, Schultz-Thater E, Remmel E, Noppen C, Schmid U, Ackermann D *et al*: **Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study.** *Int J Cancer* 2002, **100**(6):702-705.

7. Abkürzungsverzeichnis

ALDH	Aldehyddehydrogenase
ADH	Alkoholhydrogenase
AJCC	American Joint Committee on Cancer
bzw.	beziehungsweise
c DNA	complementäre Desoxyribonucleinsäure
CIS	Carcinoma in situ
CTA	cancer/testis Antigen
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
dest.	destiliert
	Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumore im Kiefer- und Gesichtsbereich
DÖSAK	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epitheliale-mesenchymale-Transition
EtOH	Ethanol
G	Grading
Gankyrin	gann ankyrin repeat protein
hCG	humanes Choriogonadotropin
HPV	humanes Papillomavirus
IL	Interleukin
IMRT	Intensity Modulated Radiotherapie
L	Lymphatic vessels
MAGE	melanom-assoziiertes Antigen
MAGE-	
A4DeltaN1	C-terminales Fragment des transmembranen MAGE-A4-Antigens
MCS	migrierende Krebsstammzellen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHD	melanom-assoziiertes Antigen homology domain
Min.	Minute
MIZ	myc-interagierendes Zinkfinger-Transkriptionsprotein
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
PCR	Polymerase chain reaction
PEC	Plattenepithelkarzinom

Rb	Retinoblastoma tumor suppressor gen
Std.	Stunde
TCR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktors
TNM	Tumor Nodus Metastasen
UICC	Union Inernational Contre Le Cancer
USA	United States of America
V	Veins
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

8. Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. Müller-Richter für die freundliche Unterstützung und Betreuung.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich in jeder Hinsicht immer unterstützt und motiviert hat und mir liebevoll und verständnisvoll zur Seite gestanden ist.

Auch bei meinem Freund und Lebensgefährten, der mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat, möchte ich mich herzlich bedanken.